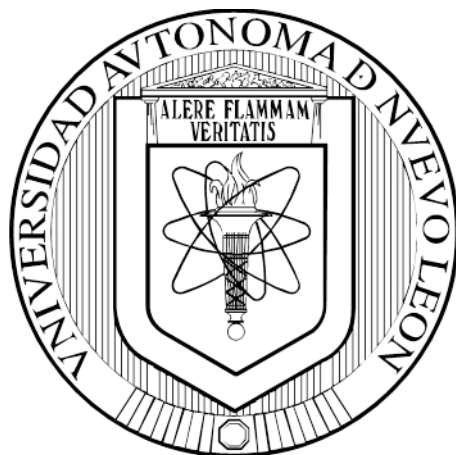


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



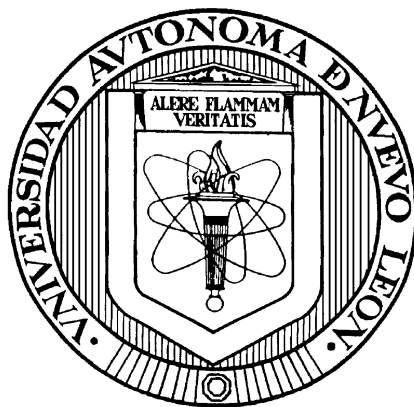
**EVALUACIÓN DE LOS PERFILES DE RESPUESTA A INTERFERÓN
INDUCIDOS COMO RESPUESTA A LA INFECCIÓN CON EL
VIRUS DEL DENGUE**

PRESENTA: DANIEL ARELLANOS SOTO

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA
MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

NOVIEMBRE 2015

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**EVALUACIÓN DE LOS PERFILES DE RESPUESTA A INTERFERÓN
INDUCIDOS COMO RESPUESTA A LA INFECCIÓN CON EL
VIRUS DEL DENGUE**

PRESENTA: M.C. DANIEL ARELLANOS SOTO

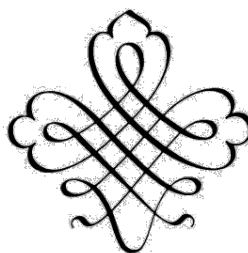
**Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación en
Biología Molecular e Ingeniería Genética**

ASESOR: DR. C. ANA MARÍA RIVAS ESTILLA

MONTERREY, N.L.

NOVIEMBRE DEL 2015

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Infectología Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como en el Laboratorio de Virología del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), unidad Zacatenco, México D.F. Fue dirigido por la Dr. C. Ana María Rivas Estilla.



EVALUACIÓN DE LOS PERFILES DE RESPUESTA A INTERFERÓN
INDUCIDOS POR LA INFECCIÓN CON EL VIRUS DEL DENGUE.

Aprobación de la tesis:



DR. C. ANA MARÍA GPE. RIVAS ESTILLA
Director de tesis



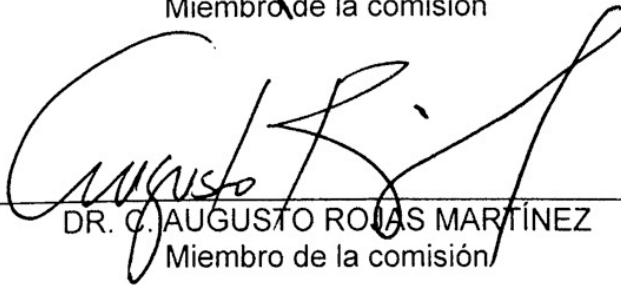
DR. C. ROSA MARÍA DEL ÁNGEL NÚÑEZ DE CÁCERES
Co-director de tesis



DR. med. JAVIER RAMOS JIMÉNEZ
Miembro de la comisión



DR. C. ILDEFONSO FERNÁNDEZ SALAS
Miembro de la comisión



DR. C. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ
Miembro de la comisión



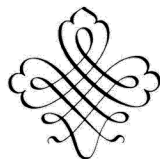
DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

COMISIÓN DE TESIS

Dr. C. Ana María G. Rivas Estilla
DIRECTOR

Dr. C. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres
CO-DIRECTOR

Dr. med. Javier Ramos Jiménez
Dr. C. Ildefonso Fernández Salas
Dr. C. Augusto Rojas Martínez
COMISIÓN



COLABORACIONES

Dr. C. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres
Dr. C. Rubén Soto Acosta
Laboratorio de Virología.
Depto. Infectómica y Patogénesis Molecular
CINVESTAV Zacatenco.
México, D.F.

M.D. Else del Carmen García García
M.C. Lizbeth Reyes Moreno
Q.C.B. María Isabel Tavitas Aguilar
Q.B.P. Juana María Chacón Reyna
Laboratorio Estatal de Salud,
Secretaría de Salud del
Estado de Nuevo León.

Dr. Ildefonso Fernández Salas
Laboratorio de Entomología Médica
Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.

Dr. José Arturo Farfán Ale
Dra. María Alba Loroño Pino
Q.F.B. Elsy del Pilar Rosado Paredes
Laboratorio de Arbovirología
Centro de Investigaciones Regionales
'Dr. Hideyo Noguchi', U.A.D.Y.

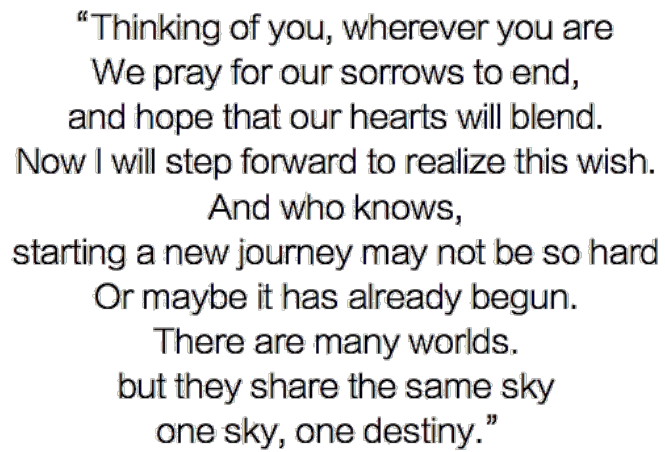
Dr. Jorge Muñoz Jordán
C.D.C. Dengue branch
Puerto Rico

Dr. Rogelio Cázares Tamez
Centro de Transfusión Sanguínea
Depto. Patología Clínica HU
Monterrey, N.L.

Dr. Andrés Ortega Soto
Centro de Transfusión Sanguínea, SSANL
Monterrey, N.L.

Q.B.P. Belén Ávila
Novogen México
Monterrey, N.L.

M.C. Kame Alberto Galán Huerta
Dr. C. José Ángel Merino Mascorro
Ped. Verónica Bravo de la Cruz
L.B.G. Eduardo Bautista Osorio
M.C.P. Nayeli María José Mendoza Tavera
M.C.P. Iker de Jesús Vincent Castillo
M.C.P. Sergio Lozano Garza
Lab. Infectología Molecular
Fac. Med. UANL



-Square Enix



Para mis padres Lourdes y Pepe, quienes me han apoyado en este camino y en cada una de las decisiones que he tomado. Los quiero mucho y les estoy eternamente agradecido por su amor incondicional en esta vida y todas las que nos falten juntos. Son todo para mí.

Para mi abuela Paula, por ser una segunda madre para mí y para mi hermana Paulina, por ser cómplice en muchas de mis locuras.
Las quiero mucho.

Para mis tíos Luis y Patty, por su cariño y consejos continuos.

Para mis hermanos Rubén y Ángel, mi familia adoptiva en Monterrey.



AGRADECIMIENTOS



Resulta complicado comenzar una lista de agradecimientos para un proyecto que comenzó un año antes de tomar la decisión de ingresar al Doctorado y en el cual he tenido participación activa desde el 2010. Todas las personas que se han cruzado en mi vida en diferentes etapas han dejado aprendizajes, todos positivos. Les estoy infinitamente agradecido por formar directa o indirectamente parte de este proyecto.

Nada de esto hubiera sido posible sin la continua ayuda y el amor de mis padres Lourdes y Don Pepe. Los amo con locura y adoración; estoy aquí porque ustedes me han ayudado y orientado a hacerlo. Nunca me detuvieron y me han impulsado a seguir adelante. La decisión fue difícil pero la logré tomar gracias a ustedes. No tengo palabras suficientes para agradecer todo lo que han hecho por mí.

A mi hermana Paulina, que a distancia nunca me ha dejado sentirme solo. Te quiero mucho bitcherita♥

A mis tíos Luis y Patty, a Carmen y Marta por ser mi familia, mi soporte en tierras lejanas a casa. Su ayuda y cariño ha sido invaluable en los más de 7 años que llevo viviendo en Monterrey... y los que me faltan. Gracias en verdad por todo.

Agradezco el formar parte de un excelente equipo de trabajo, 'Infecto-team' muchas gracias por su compañía, consejos, amistad, tener la capacidad de soportarme por tanto tiempo, regañarme y levantarme cuando lo necesité: Sonia Lozano, Verónica Bravo, Eduardo Bautista, Owen Bryan, Tanya Salas, Kame Galán, Karina Morales, Mayela Govea, Irma Vigil, Pilar Morales, Verónica Alvarado. Los amo... científicamente hablando. Agradecimientos especiales a esas personitas que conviven con nosotros sólo durante un año donde nos dan el gusto de permitirnos verlos crecer como profesionales: Iker Vincent, Héctor Ávalos, Sergio Lozano, Luis Pedro Gómez y mi querida Naye MJ Mendoza. También importante es agradecer el apoyo de los chicos que por amor al arte nos han apoyado como voluntarios: Carlos De la Cerda y Clarisa Alejandro.

Al equipo del Laboratorio de Virología IPM en CINVESTAV: Margot Cervantes, Ana Alcalá, José Humberto Pérez, Paty Carbajal, Rebeca Basave, Liliana Ramírez, Henry Puerta, Clemente Mosso, Cinthya, Jael y Fernando Medina por todas las experiencias vividas en mis dos estancias con ustedes y su disposición a enseñarme las técnicas que ustedes dominan. Me hicieron fácil desprenderme del trabajo regio e incluso desear formar parte de su grupo de trabajo. Gracias también al Dr. Juan Ludert y la Dra. Lorena Gutiérrez por su buena vibra y agradable compañía.

Al personal del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Nuevo León: Else García, Juany Chacón, Isa Tavitás, Hernán Contreras, Cruz Tavitás, Engracia de Dios Pérez y mi queridísima Liz Reyes por su continua participación y su siempre amable disposición al trabajo y a colaborar con nosotros. Estas palabras no son suficientes para agradecer toda la paciencia que me han tenido y el continuo apoyo, sabiendo que soy un gorroso de lo peor.

A Belén Ávila (Novogen) por los ratos divertidos corriendo las placas de PCR. Mil gracias por hacer ligero y placentero uno de los últimos momentos de la fase experimental de este trabajo y uno de los más críticos.

Al personal del laboratorio de la Dra. Rocío Ortiz por su amable colaboración con sus equipos y su buena vibra al trabajar con ustedes en el CIDICS.

A mis amigos Marsela Garza, Mario Simental, Adriana Sánchez, Paola Bocanegra, Blanca Álvarez, Carlos González, Yadira Pérez, Ramsés Medina, Mariel Oyervides, Gaby Rubio, Ana Victoria Villarreal, Paulina Delgado, Jorge Campos, Raúl Favela, Tania Coral, Robbi Cárdenas, Delia Guel por su presencia en mi vida. Por sus abrazos, consejos, apoyo y continuo cariño, así como las veces en que muchos cooperaron con reactivos de sus laboratorios para que yo pudiera terminar algunos de mis experimentos. Mil gracias.

A mis amigos de toda la vida: Ale Palmeros, Mel Rendón, Mau Barragán, Mar Zamora, Amanda González, Yessica Herrera, Homero Valle, Nalle Ordaz por sus mensajitos a distancia que hacen que Xalapa, DF, Guadalajara, La Paz, Campeche, Londres, Timbuctú y donde quiera que anden no se sientan tan lejos de mí.

Mis amigos que están lejos: Chuy Treviño, Mayra Domínguez, Goyo Alcázar, Marisol Herrera, Leticia Galán, Claudia Charles, Asgard Oltra, Hamid Tejas con quienes pude compartir aunque fuera un ratito sus consejos y aventuras en el transcurso de este doctorado. Gracias por sus palabras de apoyo y su cariño.

A mis profesores del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular: Dr. Hugo Barrera, Dr. Jorge Ascacio, Dr. Augusto Rojas, Dra. Rocío Ortiz, Dr. Gerardo Padilla, Dr. Francisco Velázquez, Dra. Viviana Zomosa, Dr. Carlos Córdova porque gracias a sus comentarios y consejos continúo en formación.

A los miembros de mi comisión doctoral por sus consejos, correcciones y apoyo.

Rubén Soto y Salomé Cabrera: sin ustedes mi estancia en el DF hubiera sido triste, gris y aburrida. No puedo agradecer suficiente Rube el hecho de que hayas alojado a un desconocido en casa y haber conectado desde el primer día que nos conocemos, y Salo por todo tu cariño y atenciones. Mil gracias en verdad por todo lo que hicieron por mí y por su amistad.

Elda Melchor no sé qué escribirte sin soltarme llorando mientras lo hago. Mi Barney te amo muchísimo, lo sabes. Muchas gracias por todo en verdad: por los días buenos y los malos, por las locuras y la falta de cordura y razón, que al final no son necesarias para ser feliz y sacar adelante un doctorado. Eres parte fundamental de este proyecto, Barney morado ♥

Ángel Merino mi cómplice, amigo, hermano y maestro. Dr. Merino usted fue el primer amigo de verdad que hice al llegar a Monterrey. No tengo forma de agradecer tu cariño, la buena vibra, tus locuras, tu honestidad, transparencia y por todo el apoyo y adiestramiento que me diste durante tu estancia en el laboratorio como Merino-senpai. Como senior me dejaste unos zapatos muy grandes de llenar, y creo haber realizado el trabajo de forma decente. Por todo el camino que nos queda por seguir y las aventuras que se dejen venir, como sea y donde sean pero juntos sin duda: Cheers! 'Keep walking...'

Rubén Dávila entraste solito a mi vida y ocupaste un lugar privilegiado. Gracias hermano mío por todo tu cariño y compañía en momentos difíciles. Me viste en lo más alto y en lo más bajo, y decidiste seguir caminando a mi lado a veces sin entender el por qué hacía las cosas. No sé qué hubiera sido de mí los dos últimos años de doctorado sin tu presencia. Te quiero hasta el infinito hermanito Bu. Gracias por mantener mis pies en la tierra y ayudarme con el 'keeping it real': 'And remember: If you don't love yourself, how in the hell you gonna love somebody else?' -RP ♥

Dra. Herminia Martínez por toda su confianza y cariño. Por haberme permitido formar un ratito parte de las filas del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular ayudándome a cumplir mis sueños de docencia universitaria, así como por ser parte integral de mi formación como Doctor en Ciencias.

Dra. Rosa María del Ángel por abrirme las puertas de su laboratorio, por darme un ejemplo impresionante de una investigadora consolidada con una calidad humana inigualable. Gracias por las enseñanzas y consejos, por haberme permitido experimentar momentos que fueron fundamentales para el desarrollo de mi Doctorado en compañía de su excelente equipo de trabajo. Mi cariño eterno para usted Dra. Rosa.

Dra. Ana Rivas usted apostó por mi en el 2009 y no tengo forma de agradecerle. Se ha convertido en mi mentora y sin su apoyo, consejos, planeación, paciencia, los correos electrónicos y whatsapps a deshoras nunca hubiera acabado. Muchas gracias jefa y tutora por compartir su experiencia y cariño conmigo. No me considero digno de tantas atenciones: sin usted como pieza central este trabajo no se hubiera podido realizar. Tiene mi admiración y mi cariño por siempre.



ÍNDICE



ABREVIATURAS. FÓRMULAS Y SÍMBOLOS

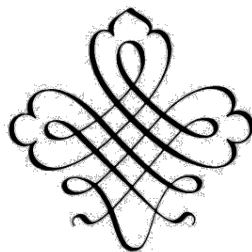
LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

RESUMEN

Capítulo I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Epidemiología	2
1.2. Mecanismos de transmisión	6
1.3. Biología molecular del DENV	9
1.4. Historia clínica de la enfermedad	15
1.5. Diagnóstico diferencial	19
1.6. Tratamiento	24
1.7. Profilaxis	27
1.8. Búsqueda de posibles blancos terapéuticos a nivel de investigación	29
Capítulo II. ANTECEDENTES	32
2.1. Antecedentes directos	32
2.2. Patogénesis de la variabilidad en la presentación clínica del dengue	33
2.3. Interferón	34
2.4. Respuesta de interferón e inducción del estado antiviral	35
2.5. Dengue e interferón	38
Capítulo III. JUSTIFICACIÓN	44
Capítulo IV. OBJETIVOS	45
4.1. Objetivo general	45
4.2. Objetivos específicos	45
Capítulo V. MATERIALES	46
5.1. Lugar de realización	46
5.2. Reactivos	46
5.3. Materiales	48
5.4. Equipo	50
5.5. Material biológico	52
5.5.1. Líneas celulares	52
5.5.2. Virus	55
Capítulo VI. MÉTODOS	56
6.1. Estrategia general	56
6.2. Métodos	56
6.2.1. Análisis del panorama epidemiológico nacional de dengue	56
6.2.2. Cultivo de células C6/36	57
6.2.3. Cultivo de células Huh-7	57
6.2.4. Cultivo de células BHK-21	57
6.2.5. Infección de cultivos celulares con DENV	58
6.2.5. Evaluación de presencia de dengue en población asintomática de Nuevo León	59

6.2.6. Recolección de muestras de sujetos infectados a dengue del estado de NL.....	59
6.2.7. Generación del banco de aislados virales.....	60
6.2.8. Titulación de aislados virales.....	60
6.2.9. Extracción de RNA total.....	60
6.2.10. Retrotranscripción (RT-MMLV).....	62
6.2.11. Confirmación molecular y serotipificación de dengue.....	63
6.2.12. Inmunohistoquímica.....	65
6.2.13. Western Blot.....	65
6.2.14. Infección de ratones lactantes.....	66
6.2.14. Arreglos de qPCR.....	67
Capítulo VII. RESULTADOS.....	71
7.1. Descripción del panorama epidemiológico del dengue en Nuevo León de 2008 a 2013.....	71
7.2. Evaluación de la presencia de infección con DENV en individuos asintomáticos de Nuevo León.....	74
7.3. Generación de un banco de muestras de individuos positivos a infección con DENV del estado de Nuevo León.....	75
7.4. Aislamiento y caracterización de partículas virales a partir de sueros de individuos infectados con DENV.....	77
7.5. Evaluación de la infectividad de las partículas virales aisladas en un sistema In vivo..	83
7.6. Evaluación de la infectividad y reproducibilidad de condiciones experimentales en cultivo celular.....	85
7.7. Evaluación de la respuesta de interferón por medio de arreglos de qPCR.....	90
Capítulo VIII. DISCUSIÓN.....	97
Capítulo IX. CONCLUSIONES.....	105
Capítulo X. BIBLIOGRAFÍA.....	107
Capítulo XI. ANEXOS.....	118
11.1. Tabla de genes evaluados en el arreglo de qPCR PAHS-016ZA (QIAGEN).....	118
11.2. Diseño del arreglo de qPCR PAHS-016ZA (QIAGEN).....	120
11.3. Técnicas y protocolos.....	121
RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.....	156



ABREVIATURAS, FÓRMULAS Y SÍMBOLOS



aa	Aminoácidos	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ATP	Adenosín trifosfato		
°C	Grados centígrados	PFU	Unidades formadoras de placa
CDC	Centro de Control y Prevención de Enfermedades	pH	Potencial de hidrógeno
		qPCR	PCR cuantitativa/ PCR en tiempo real
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario	RNA	Acido Ribonucleico
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetraacético.	RNA _m	RNA mensajero
DNA	Ácido Desoxirribonucleico	rpm	Revoluciones por minuto
Da	Daltones	RT	Transcripción reversa/ Retrotranscripción
DEPC	Dietilpirocarbonato	s	segundos
DENV	Virus del dengue	SSA	Secretaría de Salud
DENV-1	Dengue serotipo 1	SSD	Síndrome de choque por dengue
DENV-2	Dengue serotipo 2		
DENV-3	Dengue serotipo 3	Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
DENV-4	Dengue serotipo 4	TBE	Buffer Tris-Borato-EDTA
DENV	Virus del dengue	UV	Ultravioleta
DH	Dengue hemorrágico	V	Volts
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatados		
ELISA	Ensayo inmunoenzimático		
FD	Fiebre de dengue		
g	Gramos		
H ₂ O	Agua		
HI	Inhibición de la hemaglutinación		
Hpi	Horas post-infección		
IF	Inmunofluorescencia		
IFN	Interferón		
IgG	Inmunoglobulina de isotipo G		
IgM	Inmunoglobulina de isotipo M		
IHQ	Inmunohistoquímica		
Kb	Kilobases		
KDa	Kilodaltones		
M	Molar		
μM	Micromolaridad		
mM	Milimolaridad		
MOI	Multiplicidad de infección		
MWM	Marcador de peso molecular		
ng	Nanogramos		
nM	Nanomolaridad		
OMS	Organización Mundial de la Salud		
pb	Pares de bases		

LISTA DE FIGURAS



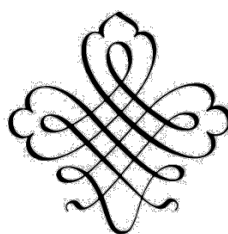
NO.	TÍTULO	PÁG
1	Aumento en los casos de infecciones con el virus del dengue a nivel mundial de 1943 a 2013	2
2	Estadística comparativa de los casos reportados de dengue a nivel mundial en el periodo comprendido entre los años 1955 - 2007	3
3	Dinámica de transmisión del dengue	7
4	Estructura de la partícula viral del dengue	9
5	Estructura del genoma viral del dengue y sus productos proteicos	10
6	Ciclo de replicación del virus del dengue	13
7	Distribución geográfica de los distintos genotipos del dengue a nivel mundial	15
8	Manifestaciones clínicas del dengue	16
9	Historia clínica del dengue	19
10	Esquema comparativo de los diferentes métodos de diagnóstico del dengue	20
11	Mecanismo de inducción de interferón e inducción del estado antiviral	36
12	Mecanismo general de la evasión de la respuesta de IFN que presenta el virus del dengue	39
13	Actividad de las proteínas no estructurales del DENV sobre la señalización JAK-STAT para modular la respuesta de interferón	40
14	Micrografía de una monocapa de células C6/36	52
15	Micrografía de una monocapa de células Huh-7	53
16	Micrografía de una monocapa de células BHK-21	54
17	Estrategia general del trabajo desarrollado en la presente tesis	56
18	Disposición de los genes de estudio dentro del arreglo PAHS-016A para respuesta a IFN tipo I	68
19	Esquema general para la evaluación de la respuesta de interferón en células Huh-7 infectadas con DENV	69
20	Número de casos nacionales de dengue desglosados por semana epidemiológica en el periodo 2008 – 2013	71
21	Contribución del estado de Nuevo León al total de casos nacionales en el periodo 2008 – 2013	72

NO.	TÍTULO	PÁG
22	Número de casos de dengue en Nuevo León desglosados por semana epidemiológica durante el periodo 2008 – 2013	72
23	Número de casos de dengue en Nuevo León en el periodo 2008 – 2013 desglosados por semana epidemiológica y representados en orden de año de registro	73
24	Total de casos confirmados de dengue en Nuevo León en el periodo 2008 – 2013	73
25	Resultados de las pruebas realizadas para los 2061 sueros de donantes asintomáticos	75
26	Georreferenciación de los casos de dengue identificados por LESP, recolectados de septiembre 2010 a junio 2014	77
27	Cultivo de DENV en células C6/36	78
28	Evaluación molecular del virus del dengue por medio del protocolo de Lanciotti	79
29	Inmunohistoquímica de células C6/36 infectadas con DENV realizando el marcaje con anticuerpo 4G2	80
30	Filogenia de los aislados virales obtenidos caracterizados como DENV-1	81
31	Filogenia de los aislados virales obtenidos caracterizados como DENV-2	82
32	Procedimiento de inoculación intracerebral de dengue en ratones BALB/c lactantes, evolución de la infección y cosecha del cerebro para su posterior macerado.	84
33	Infección de células BHK-21 con DENV prototipo y aislados de pacientes	86
34	Infección de células Huh-7 con DENV prototipo y aislados de pacientes	87
35	Cuantificación de partículas virales producidas	88
36	Evaluación en la inducción de STAT-1	89
37	Diseño experimental de la infección con DENV y tratamiento con IFN	91
38	Electroforesis capilar de los RNAs extraídos	92
39	Mapa de calor de los genes modulados por IFN	94
40	Esquemas de ‘nubes de palabras’ en cultivos de células Huh-7 infectados con DENV1	95
41	Esquemas de ‘nubes de palabras’ en cultivos de células Huh-7 infectados con DENV2	96

LISTA DE TABLAS



NO	TÍTULO	PÁG
.		
1	Casos de dengue en América registrados del año 2002 al 2007	4
2	Porcentaje de serotipos circulantes en México entre 1995-2002	5
3	Funciones de las diez proteínas codificadas por el virus del dengue	12
4	Comparación de las técnicas para diagnóstico del dengue más usadas	23
5	Tratamiento recomendado por la SSA para el paciente con dengue	25
6	Fases de desarrollo de múltiples vacunas contra el dengue	28
7	Ejemplos de algunos genes estimulados por interferón (ISG) y su función	37
8	Mecanismos de evasión de la respuesta de IFN que presentan algunos virus	38
9	Características de los virus prototipo empleados	55
10	Condiciones de reacción para la RT. Primera mezcla.	62
11	Condiciones de reacción para la RT. Segunda mezcla.	62
12	Programa de reacción de retrotranscripción	63
13	Secuencias de los primers empleados para la PCR de Lanciotti	63
14	Condiciones de reacción para la detección molecular de DENV	64
15	Programa de temperaturas para la detección molecular de dengue	64
16	Casos y serotipos de dengue confirmados en Nuevo León en el periodo 2008 – 2013	74
17	Epidemiología de los sueros positivos a dengue recolectados.	76
18	Lista de aislados virales, año de recolección y serotipo confirmado	79
19	Títulos virales de algunos aislados cultivados en células C6/36	83
20	Titulación viral y cuantificación de NS1 de macerados de cerebro de ratón infectados con DENV	85
21	Concentración y parámetros de calidad de los RNAs extraídos	92



RESUMEN



EVALUACIÓN DE LOS PERFILES DE RESPUESTA A INTERFERÓN INDUCIDOS POR LA INFECCIÓN CON EL VIRUS DEL DENGUE

Introducción: El dengue es la principal enfermedad viral transmitida a humanos por artrópodos. Una de las características del cuadro clínico de la infección por el virus del dengue (DENV) es su alta variabilidad en la severidad, pronóstico y resolución de la enfermedad. Estudios recientes sugieren que diferentes cepas virales parecen inducir respuestas de interferón variables y que de ello pudiese depender la presentación clínica. No existen estudios previos que evalúen este fenómeno en cepas virales circulantes en México. Sumado a esto, se ha reportado que 80% de las infecciones por DENV son asintomáticas: por lo tanto, los donadores de sangre virémicos son un riesgo para la seguridad en transfusiones. También nos propusimos estudiar si la seroprevalencia de anticuerpos anti-DENV permanecía constante en donadores de sangre con respecto al tiempo.

Objetivo: Conocer la contribución epidemiológica e impacto del dengue en Nuevo León, así como establecer si existe una asociación entre la patogénesis y la variabilidad genética de los serotipos 1 y 2 del DENV, mediante la evaluación de los perfiles de expresión y respuesta a interferón, en cultivos celulares infectados con cepas virales aisladas a partir de sujetos mexicanos virémicos.

Materiales y métodos: Se hizo un estudio retrospectivo de los registros semanales de CENAVECE para conocer el panorama actual oficial del dengue en Nuevo León. En colaboración con el banco de sangre HU y el Centro Estatal de la Transfusión se recolectaron 285000 donaciones de sangre en el periodo de enero 2010 a diciembre 2012, con carta de consentimiento informado. A 2061 donadores sanos se les realizó ELISA para buscar anticuerpos contra Brucella, VHC, VDRL, HBsAg, HIV1 y 2, WNV, DENV IgM-IgG. Los sueros positivos a DENV se confirmaron por detección de NS1-DENV y RT-qPCR. A la par en colaboración con LESP-NL se recolectaron 1079 sueros NS1-DENV positivos de Nuevo León los cuales se analizaron por PCR en tiempo real para identificar serotipos, y fueron sembrados en células C6/36 para aislar partículas virales. Los virus aislados se titularon en células BHK-21. Posteriormente, se infectaron células Huh-7 a una m.o.i. de 0.1 durante 36h. Se usaron como control virus prototipo inactivados con luz UV. Transcurrido el tiempo de infección, las células se trataron 1h con IFN α (1000UI/mL). Los RNAs totales se montaron sobre arreglos de PCR tiempo real (PAHS-016Z, QIAGEN) para evaluar la respuesta de interferón de las cepas aisladas de pacientes.

Resultados: Se encontró que en el transcurso de 5 años, el estado de Nuevo León pasó del lugar 12 al 5° con mayor incidencia de dengue a nivel nacional, y que la seroprevalencia de anticuerpos anti-DENV en donadores asintomáticos fue del 2.6%. Se aislaron 13 virus a partir de cultivos celulares infectados con sueros NS1 positivos y los virus tuvieron la capacidad de infectar otras líneas celulares, generar partículas infecciosas funcionales y de generar enfermedad en un sistema In vivo. Al infectar células Huh-7 se observó que las cepas virales tenían una capacidad diferente para modular la respuesta de interferón, regulando con diferente intensidad diferentes genes involucrados en el establecimiento del estado antiviral intracelular. Los virus serotipo 2 indujeron niveles de expresión más altos que los virus serotipo 1.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN



El dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos a humanos más frecuente del mundo, con cerca de la mitad de la población mundial en riesgo de infectarse en algún momento de su vida.¹ Sus manifestaciones clínicas varían en severidad desde un síndrome febril autolimitado conocido como fiebre de dengue o dengue clásico, hasta una fiebre hemorrágica o dengue hemorrágico.² La complicación más grave, el síndrome de choque por dengue es potencialmente fatal.² El alto predominio de la enfermedad, la carencia de una vacuna eficaz y la ausencia de un tratamiento antiviral específico sitúan a este padecimiento como un serio problema reemergente a nivel mundial.³

El agente etiológico de la enfermedad es el virus del dengue, miembro del género *Flaviviridae* y de la familia Flavivirus.³ Se han descrito cuatro tipos de virus del dengue altamente relacionados entre sí (serotipos), con la capacidad de causar el mismo cuadro patológico al infectar al hospedero humano.²

Los mecanismos moleculares implícitos en la fisiopatogenia de la enfermedad producida por este virus aun se desconocen ampliamente. Por lo que numerosos grupos de investigación se han dado a la tarea de abordar diferentes aspectos del ciclo de replicación viral y su relación con las alteraciones metabólicas a nivel celular y su relación con la presentación clínica que va desde el espectro asintomático hasta el dengue hemorrágico.^{2,3}

1.1. Epidemiología

Los reportes más antiguos de una enfermedad similar al dengue provienen de China (265-420 D.C.).^{4,5} El primer brote epidémico reportado ocurrió entre 1799 y 1780 simultáneamente en Egipto, Indonesia, India y Estados Unidos.⁴ Los orígenes del término “dengue” no son muy claros. El término parece haber surgido a partir de la frase Swahili ‘*Ki-dinga pepo*’ que define a la enfermedad como una plaga ocasionada por un espíritu maligno.⁵ La primera descripción del cuadro sintomático fue realizada por Benjamín Rush en 1780 después de comparar pacientes en Filadelfia durante la epidemia en Estados Unidos.⁶ En ese momento el término popular empleado para nombrar a la enfermedad era ‘Fiebre quebrantahuesos’ debido al cuadro sintomático que se presenta.⁷

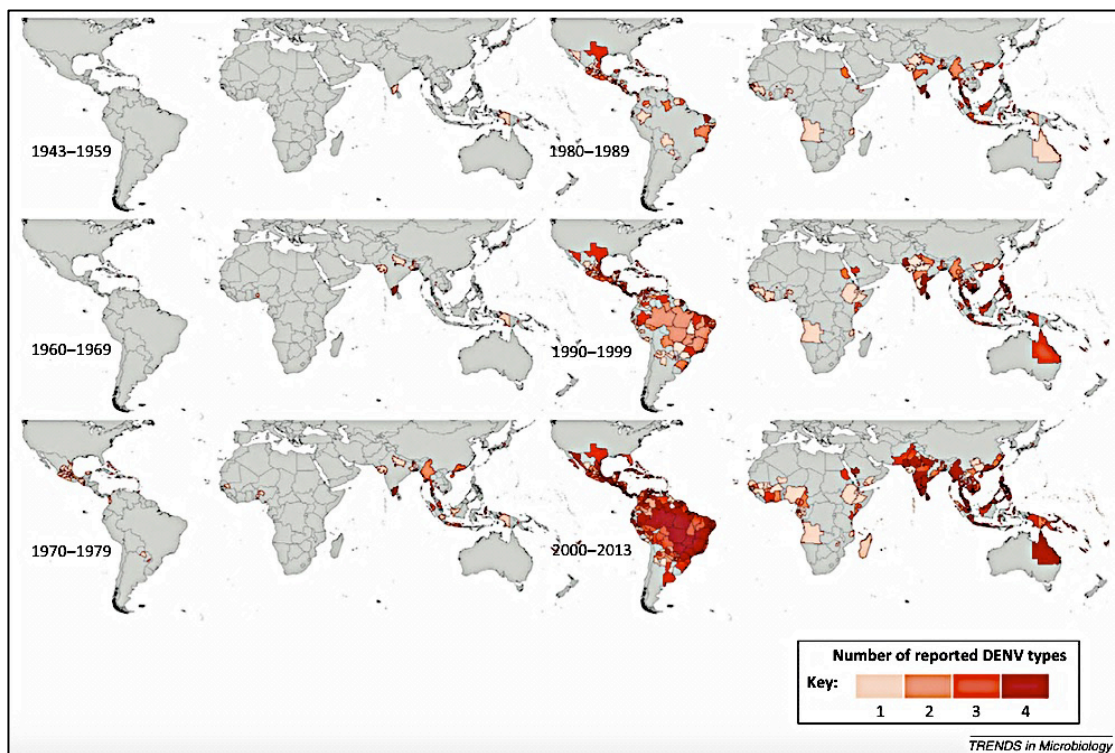


Figura 1. Aumento en los casos de infecciones con el virus del dengue a nivel mundial de 1943 a 2013.

El dengue es la enfermedad transmitida por vector que se ha diseminado en mayor medida a nivel mundial durante los últimos 50 años y la causante de la fiebre hemorrágica con mayor incidencia.¹ Las razones para esto incluyen una elevación en la frecuencia de brotes epidémicos y la cambiante distribución del virus y el vector.

La enfermedad se ha vuelto endémica en más de 100 países (**Figura 1**), aunque se le sigue considerando un padecimiento de zonas tropicales y subtropicales.⁸ Fenómenos naturales como ‘el Niño’ y los efectos del continuo calentamiento global, con el paso del tiempo incrementarán el número de zonas en las cuales el ambiente será apto para la transmisión de la enfermedad, representando un riesgo potencial para la población mundial.

9, 10

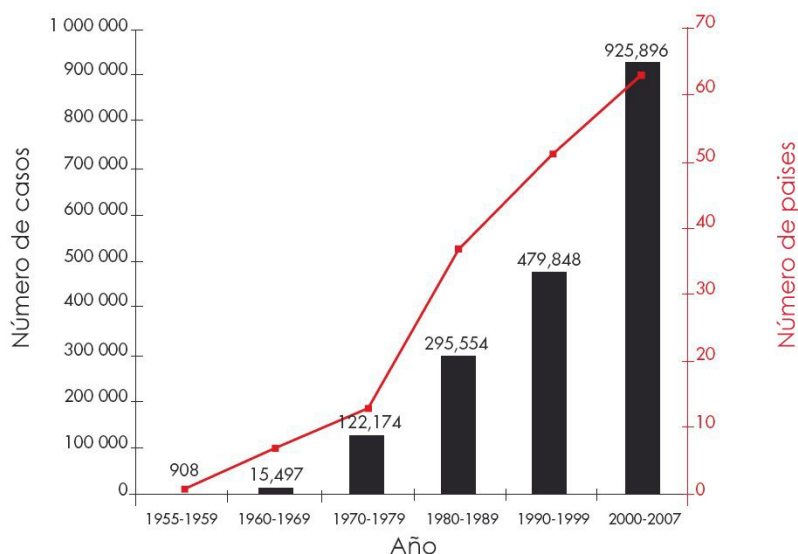


Figura 2. Estadística comparativa de los casos reportados de dengue a nivel mundial en el periodo comprendido entre los años 1955 - 2007.¹⁰

En los últimos 50 años la incidencia de la enfermedad ha aumentado 30 veces, con expansión geográfica a nuevos países tanto en zonas urbanas como rurales.¹¹ Se estima que anualmente ocurren 50 millones de



infecciones nuevas y aproximadamente 2.5 billones de personas habitan en países endémicos.^{10, 12}

Es importante mencionar que la resolución EHA58.3 de la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluye al dengue como un ejemplo de enfermedad que constituye un problema emergente de salud pública a considerar como asunto de seguridad nacional.^{13,14} El dengue representa una carga económica y social para los sistemas de salud pública en las zonas endémicas. El número de casos anuales reportados a la OMS variaron de 0.4 a 1.3 millones en la década de 1996 a 2005.^{8,10} Los casos no reportados y los malos diagnósticos son los mayores obstáculos a superar para conocer el panorama mundial real.¹⁰ **(Figura 2)**

El dengue es una enfermedad cada vez más frecuente en el sudeste asiático, el continente americano y otras regiones del mundo. En los últimos cinco años, América Latina ha experimentado un aumento inusitado de casos de dengue y dengue hemorrágico.⁸

País	2003	2004	2005	2006	2007
Brasil	341,902	112,928	203,789	346,550	481,316
Colombia	52,588	27,523	30,475	36,471	41,773
Venezuela	26,996	30,693	42,198	39,860	80,646
Costa Rica	19,699	9,408	37,798	12,124	26,440
México	5,018	8,202	16,862	27,287	456
Honduras	16,559	19,971	18,843	8,436	33,508
Resto	48,004	53,645	59,373	57,419	90,695
Total	510,736	262,370	409,338	528,147	802,834

Tabla 1. Casos de dengue en América registrados del año 2002 al 2007.⁸

El número de casos en América se ha incrementado de 267 mil en 2003 a más de 550 mil en 2006 **(Tabla 1)**. La mayor proporción correspondió a Brasil, país que ha llegado a contribuir con más de la mitad de lo notificado cada año, seguido en orden de frecuencia por Colombia, Venezuela, Honduras y México, aunque éstos últimos, con una menor magnitud.⁸



Durante 2007, se registraron más de 800 mil casos de dengue, 46.1% más, que en el año anterior. Del total de casos notificados en el 2007, 25,811 correspondieron a casos hemorrágicos.⁸

México es un país endémico con brotes re-emergentes, donde se ha reportado la presencia de los cuatro serotipos virales circulando simultáneamente desde el año 2004. El serotipo DENV-1 se detectó en Centroamérica y Yucatán en el año 2002, pero desde 1994 no se le había relacionado con brotes epidémicos.^{15, 16} El serotipo DENV-2 se detectó en 1999 en Chiapas, extendiéndose en el 2000 hacia Veracruz y Oaxaca, en el 2001 a Guerrero y la península de Yucatán y en el 2002 hacia el Pacífico Occidental, Estado de México, Tamaulipas, Hidalgo y Coahuila.^{15, 16} El serotipo DENV-3 se dejó de detectar a nivel nacional en el año 1999, pero reemergió en el 2002 en brotes epidémicos en diversos estados.^{15, 16} DENV-4 se detectaba en 1995 y 1996 en el sur del país, pero a partir de 1999 su incidencia disminuyó.^{15, 17} **(Tabla 2)**

Serotipos	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002
1	16.7	27	6.5	5	3	0.7	-	0.7
2	38.6	2	1.6	2	13.4	55.2	75	65.6
3	8.8	60	88.3	93	81.7	44.1	25	33.7
4	35.9	11	3.6	-	1.9	-	-	

Tabla 2. Porcentaje de serotipos circulantes en México entre 1995-2002.¹⁷

El dengue se encuentra presente en México desde la década de los años setenta con variaciones anuales en su incidencia y brotes epidémicos de diferentes magnitudes, principalmente en los estados de la región sureste, Pacífico y Golfo de México.^{8,18} En esas regiones, la transmisión es atribuible a factores tales como la circulación viral, presencia y abundancia del vector, migración, densidad poblacional, intensificación de los fenómenos hidrometeorológicos y otros factores específicos que involucran la operación



del Programa de Prevención de la transmisión de la enfermedad a cargo de la Secretaría de Salud en los estados.^{8, 10, 11}

El dengue reingresó a finales de los años setenta a México y se extendió por todo el país. En la actualidad presenta variaciones anuales en su incidencia y brotes epidémicos de diferentes magnitudes, en particular en los estados de la región sur-sureste y costas del Océano Pacífico y Golfo de México, con eventos epidemiológicos más esporádicos en los estados del centro y norte del país.^{8,18}

Para el periodo 2001-2007 se observó una tendencia anual ascendente, en la que estados como Veracruz, Chiapas, Quintana Roo, Tamaulipas, Nayarit, Jalisco y Sonora han contribuido a mantener una presencia de casos, cada vez mayor, alcanzando para 2007 las cifras más altas en lo que va de la década, tanto de dengue clásico, como hemorrágico.¹⁸ El comportamiento de la transmisión denota aumentos anuales progresivos, con repuntes en el segundo semestre de cada año. No obstante, en México se observan incrementos en la transmisión al inicio de cada ciclo anual.^{8, 18, 19, 20}

1.2. Mecanismos de transmisión

El principal mecanismo de transmisión del DENV es a través de la picadura de mosquitos. Los vectores más comunes para el virus del dengue son los mosquitos hematófagos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*.²¹ Estas especies se han adaptado a la convivencia con humanos, a menudo proliferando en acumulaciones de agua en basureros, patios y jardines o en contenedores desechados por humanos. Los mosquitos *Aedes* se alimentan durante el día.²² Si se les perturba durante su alimentación suelen buscar gente cercana para morderlos, teniendo el potencial de infectar con el virus a todos los miembros de una familia o de un grupo, quienes desarrollarán la infección entre 24 y 36 horas post-inoculación inicial.^{9, 13, 22}

Existen reportes de un ciclo de transmisión enzoótico del virus del dengue en bosques y selvas de Asia y África que involucra a primates inferiores como hospederos.⁹ Sin embargo, el ciclo de transmisión más importante es el urbano o epidémico. El humano es el hospedero de excelencia debido a la alta viremia sistémica que se produce, eliminando la necesidad de un hospedero enzoótico para amplificar al virus.^{9, 23} Los mosquitos adquieren el virus cuando se alimentan de un humano virémico, y pueden transmitir el virus si pican a otro humano de 8 a 12 días después de la ingesta inicial.²⁴ Este periodo se denomina *incubación extrínseca* y representa el tiempo en el cual el virus se replica en las glándulas salivales del vector, el cual permanece infectado durante el resto de su periodo de vida (15 a 65 días). Se ha documentado transmisión vertical del virus en mosquitos (transmisión trans-ovárica, *TOT*), lo cual significa que los mosquitos infectados pueden pasar el virus a los descendientes jóvenes.²³ (Figura 3)

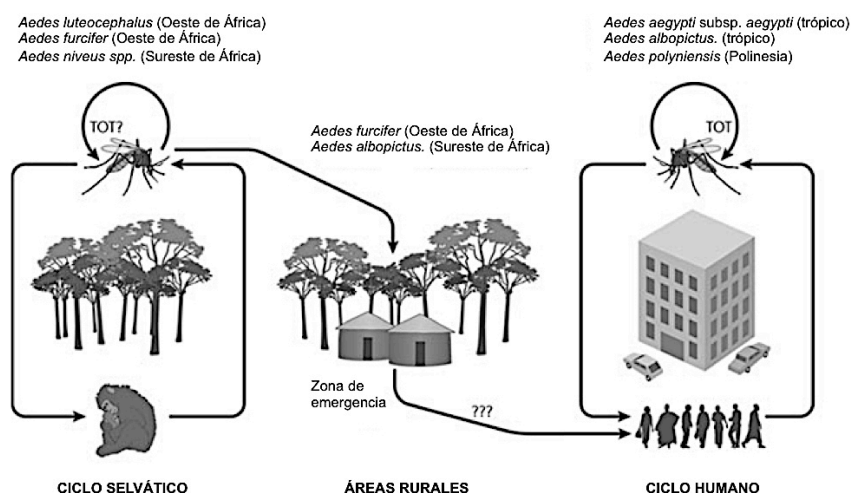


Figura 3. Dinámica de transmisión del dengue²⁵

El riesgo de ser mordido por un mosquito es más alto durante el inicio de la mañana y en las últimas horas de la tarde antes de la puesta del sol, ya que son los periodos en los cuales las hembras se alimentan con mayor frecuencia.²⁶ Sin embargo esto no representa una limitante, puesto que



pueden alimentarse a cualquier hora del día.²² Una vez que el virus se ha inoculado en el humano, el virus se replica entre 3 y 14 días en un periodo denominado *incubación intrínseca*, que antecede a la aparición de la sintomatología de la fiebre de dengue.^{23, 25}

Aunque no se ha documentado la transmisión directa del virus de persona a persona, existen reportes de casos originados por donación y transplante de órganos y médula ósea²⁷ lesiones ocasionadas por punzocortantes (agujas) y contacto con membrana mucosa contaminada.^{26, 27, 28} También se considera actualmente a la enfermedad como un riesgo ocupacional para el especialista en el campo de la salud, puesto que se han reportado casos de transmisión del virus de paciente a médico, ocasionados por lesiones con agujas contaminadas con sangre virémica.^{29, 30}

El dengue se está diseminando rápidamente a zonas nuevas, y la frecuencia de brotes epidémicos está aumentando. También se ha observado que la edad de los pacientes con dengue está aumentando. Esto representa un riesgo en el medio clínico debido a que potenciales donadores de sangre se han convertido en un grupo de riesgo.³¹

El riesgo de transmisión de la enfermedad a través de transfusiones sanguíneas provenientes de donadores virémicos asintomáticos es un riesgo latente, sumado a que incluso en zonas endémicas en los bancos de sangre no es común hacer detección de dengue en paquetes de sangre completa o de componentes.³¹ En países endémicos, como en Singapur, el riesgo estimado de contraer la enfermedad es de 1.6 a 6 casos por cada 10000 transfusiones.²⁹

Se ha reportado transmisión vertical del dengue durante embarazo o durante el nacimiento, con madres gestantes mientras cursan con fiebre de dengue clásico o hemorrágico.³² En Malasia, país endémico para dengue, la

Universidad de Malaya realizó un estudio en el cual demostró que 2.5% de las parturientas cursaban con una infección reciente por dengue, mientras que la tasa de transmisión vertical en los casos estudiados fue del 1.6%.³³

1.3. Biología molecular del DENV

El estudio inicial del dengue implicaba a bacterias, protozoarios y espiroquetas como posibles agentes causales. Fue hasta 1907 que Asburn y Craig evidenciaron la etiología viral de la enfermedad, convirtiendo al virus del Dengue en el segundo patógeno viral identificado después del virus de la fiebre amarilla.³⁴ El virus fue aislado hasta 1943 y años después la comunidad científica identificó que la enfermedad podía ser causada por cuatro serotipos diferentes.^{34, 35}

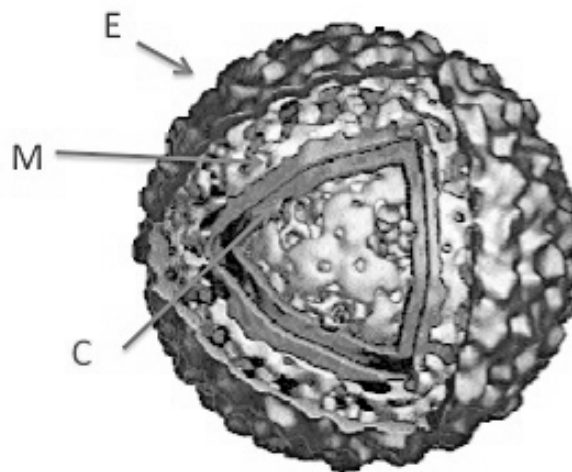


Figura 4. Estructura de la partícula viral del dengue.^{39, 40}

El virus del dengue (DENV) es un miembro de la familia Flaviviridae y del género *Flavivirus*.³⁶ La partícula viral contiene un genoma de RNA de cadena de polaridad positiva, dentro de una cápside con simetría icosaédrica, y rodeado por una envoltura externa en la cual se encuentran insertas las proteínas prM y E.^{37,38}

Dispone de una membrana de naturaleza lipídica, que envuelve completamente al virión. Físicamente, el virus es esférico, con un tamaño que varía de 40 a 50 nm de diámetro, presentando pequeñas proyecciones superficiales de 5 a 10 nm.^{38,39} (Figura 4)

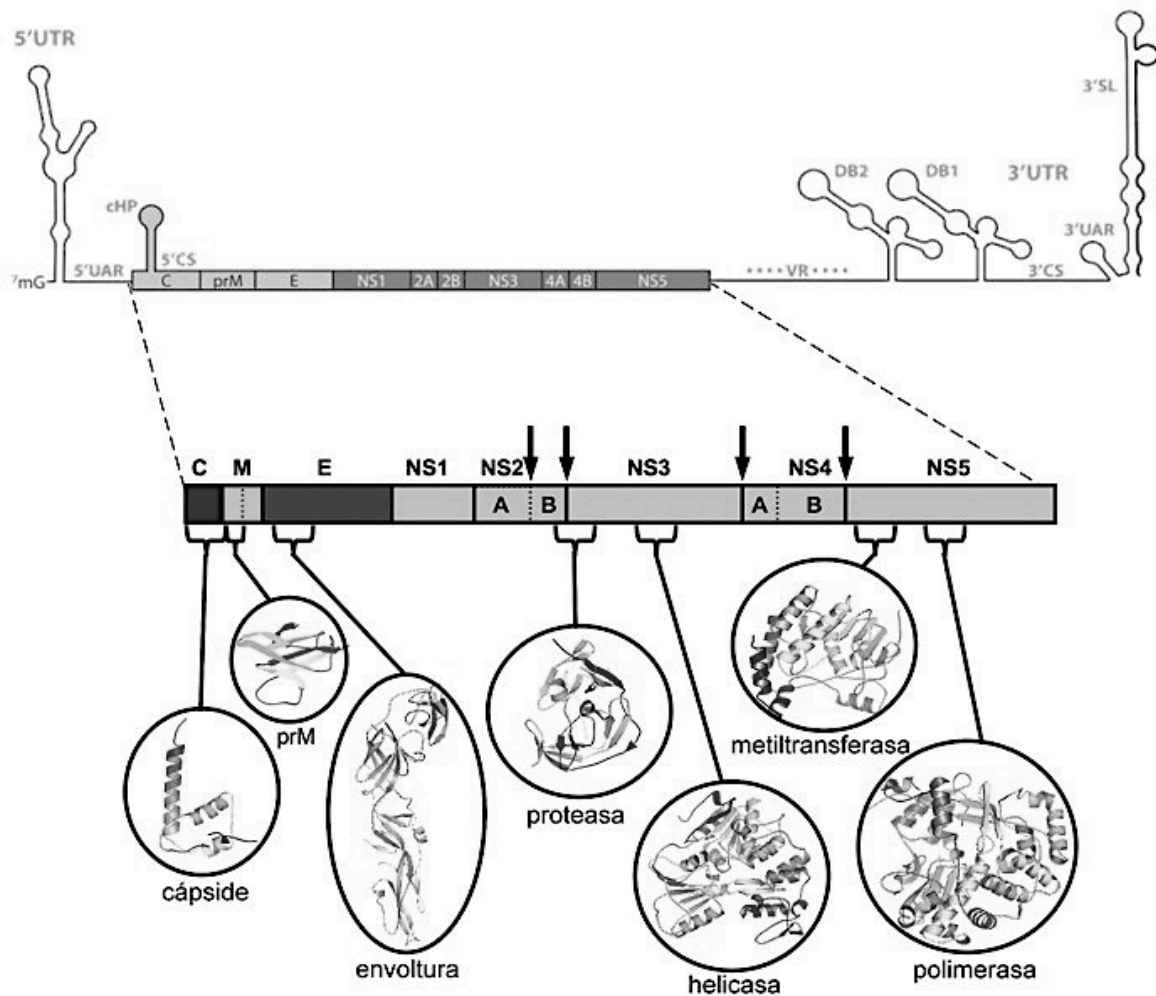


Figura 5. Estructura del genoma viral del dengue y sus productos proteicos.^{38,39}

El genoma del virión tiene un tamaño de aproximadamente 11 Kb y un marco de lectura abierto (ORF) único, flanqueado por dos regiones 5' y 3' no traducidas (UTR) que le proporcionan estabilidad y contienen regiones de control.^{38,39}



El ORF codifica para una única poliproteína, la cual sufre diversos procesos de corte para generar proteínas virales individuales.²⁴ Las tres proteínas estructurales (C, M y E) están localizadas en el extremo amino terminal, mientras que las proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) se encuentran contenidas en el extremo carboxilo de la poliproteína.^{39,41} **(Figura 5)**

El genoma de RNA del DENV y de todos los Flavivirus, tiene por característica presentar un *cap* (casquete o capuchón) de guanina (m7GpppAmp) en su extremo 5' y carecer de un tracto poliadenilado en su extremo 3'.⁴² Presenta además un marco de lectura abierto que varía en tamaño de acuerdo con cada serotipo del virus, incluso entre serotipos homólogos.^{42, 43}

Tanto la naturaleza del receptor (residuos de heparán sulfato o proteínas) como el mecanismo de entrada (endocitosis o fusión en membrana) están en discusión.^{57,58} El genoma es traducido a una única poliproteína, que es procesada por proteasas virales y celulares para sintetizar simultáneamente todas las proteínas virales intracelulares: que corresponden a tres proteínas estructurales (C, prM y E) y siete no estructurales (NS), que cumplen diversas funciones durante el ciclo de replicación.⁴³ **(Tabla 3)**



PROTEÍNA	FUNCIÓN	REFS
Core (C)	Entrada y ensamble de nuevos viriones.	44, 45
Proteína asociada a membrana (prM)	Entrada y ensamble de nuevos viriones.	44, 45
Envoltura (E)	Entrada y ensamble de nuevos viriones.	44, 45
NS1	Glicoproteína relacionada con la replicación del RNA viral. Parece asociarse con las proteínas de la célula hospedero y puede encontrarse en balsas lipídicas en la superficie celular. Actividad de transducción de señales.	46, 47, 48
NS2A	Une el complejo de replicación viral al retículo endoplásmico. Coordinación entre empaquetamiento y replicación del RNA.	45, 47
NS2B	Cofactor de NS3.	45, 50
NS3	Serín-proteasa viral que usa a NS2B como cofactor. Actividad de trifosfatasa y RNA helicasa.	45, 52
NS4A	Anclaje del complejo de replicación viral a la membrana del retículo endoplásmico.	49, 52
NS4B	Anclaje del complejo de replicación viral a la membrana del retículo endoplásmico. Elemento de inhibición de la señalización de IFN.	45, 53, 54
NS5	Metiltransferasa. RNA dependiente RNA polimerasa viral. (RdRp)	45, 55, 56

Tabla 3. Funciones de las diez proteínas codificadas por el virus del dengue.

La RNA polimerasa RNA-dependiente viral (NS5), asociada a otras proteínas NS, replica el RNA genómico produciendo una molécula complementaria de RNA de polaridad negativa, la que a su vez actúa como templado para la síntesis de nuevas cadenas de RNA de polaridad positiva.⁵⁹

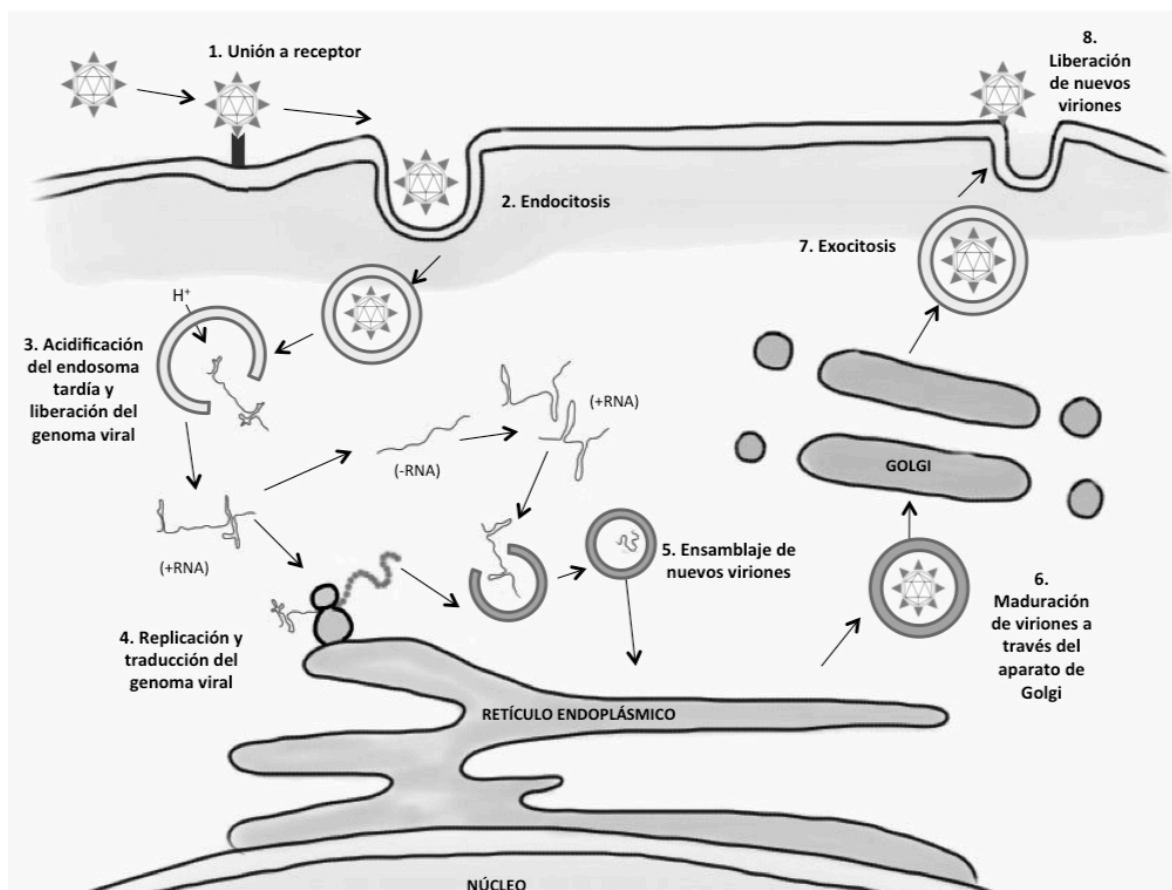


Figura 6. Ciclo de replicación del virus del dengue.

Las réplicas de genoma viral son encapsidadas por la proteína C y luego, las nucleocápsides adquieren su envoltura a partir de la membrana del retículo endoplásmico hacia el espacio luminal.³⁴ A partir de allí, las partículas virales son transportadas por el sistema exocítico secretorio hacia la superficie en tanto que las glicoproteínas virales adquieren su forma madura por procesamiento de los residuos hidrocarbonados en el sistema de Golgi y, finalmente, los viriones son liberados al medio extracelular por fusión de la vesícula de transporte con la membrana plasmática.⁶¹ (**Figura 6**)



Se han descrito cuatro tipos de virus capaces de causar fiebre de dengue. A estos cuatro virus se les ha denominado **serotipos**, debido a que tienen epítopes comunes en la proteína de la envoltura, lo que ocasiona una elevada reactividad cruzada en pruebas serológicas.⁶² A nivel genómico, estos serotipos virales difieren aproximadamente un 30% en su secuencia nucleotídica.⁶³

En humanos, cada uno de los cuatro serotipos virales se ha asociado con dengue clásico y dengue hemorrágico. Estudios realizados en Cuba y Tailandia han mostrado una alta asociación consistente entre la infección con el serotipo DENV-2 y casos de fiebre hemorrágica/ choque de dengue, pero entre 1976-1978 en Indonesia, 1980-1982 en Malasia, 1989-1990 en Tahití y desde 1983 hasta la actualidad en Tailandia, se ha observado que el serotipo que más incidencia presenta en los casos complicados es el DENV-3.⁶⁴ Sin embargo no es regla, puesto que en México en 1984, Puerto Rico en 1986 y El Salvador en 1989 se diagnosticaron pacientes complicados con el serotipo DENV-4.⁶⁴

En general, los casos complicados se presentan con mayor frecuencia en dos grupos de pacientes inmunológicamente definidos: niños que han sufrido una reinfección y niños que portan anticuerpos maternos contra el virus del dengue. Actualmente se desconoce el mecanismo o los factores que influyen para que un paciente evolucione hacia una fase crítica.⁶⁴

Actualmente el análisis del genoma de los serotipos virales ha sido la pieza central de los estudios en la evolución y epidemiología del dengue. En particular, cada uno de los serotipos presenta diversidad genética extensa en forma de clusters filogenéticamente relacionados que se han denominado **genotipos**.^{63, 65}

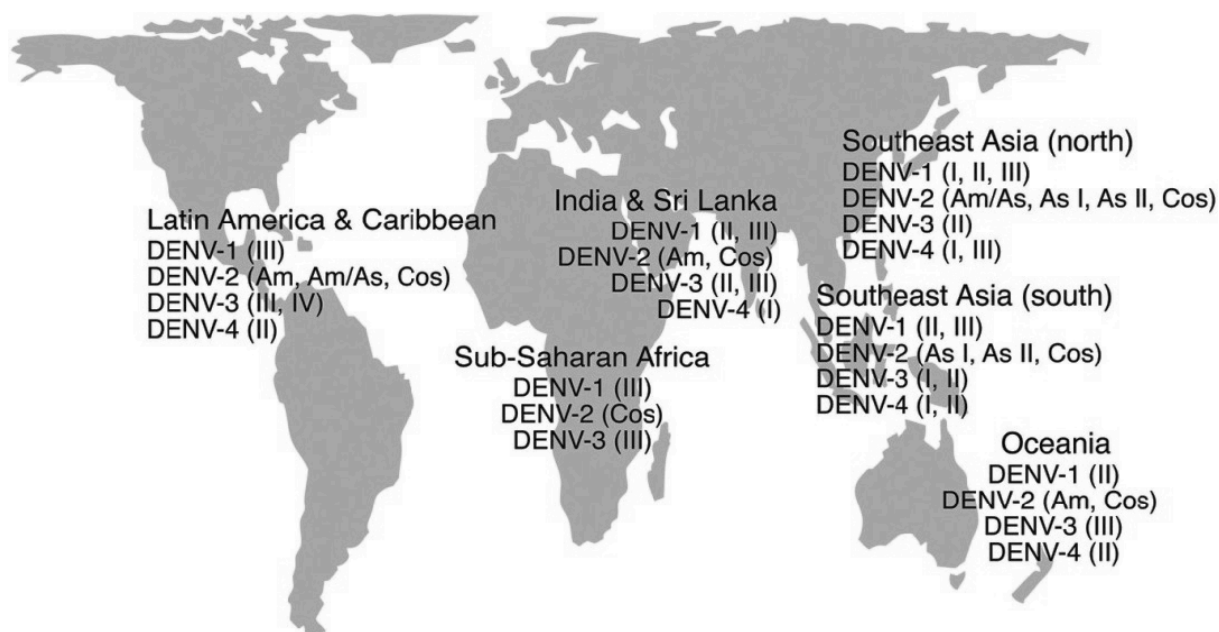


Figura 7. Distribución geográfica de los distintos genotipos del dengue a nivel mundial.⁶³

Los genotipos se han definido dependiendo de la región geográfica que ocupan: americano, asiático/americano, asiático I, asiático II y cosmopolita. (Figura 7) Sumado a esto se ha reportado que la posibilidad de la sustitución del genotipo viral circulante en una población por uno distinto pudiera ser la causa de los brotes epidémicos reemergentes.^{63, 65}

1.4. Historia clínica de la enfermedad

La infección por dengue es una enfermedad sistémica y dinámica. Tiene un amplio espectro clínico que incluye manifestaciones severas y no- severas: Después del periodo de incubación intrínseco la enfermedad comienza repentinamente y es seguida por tres fases: febril, clínica y de recuperación.

¹⁰ (Figura 8)

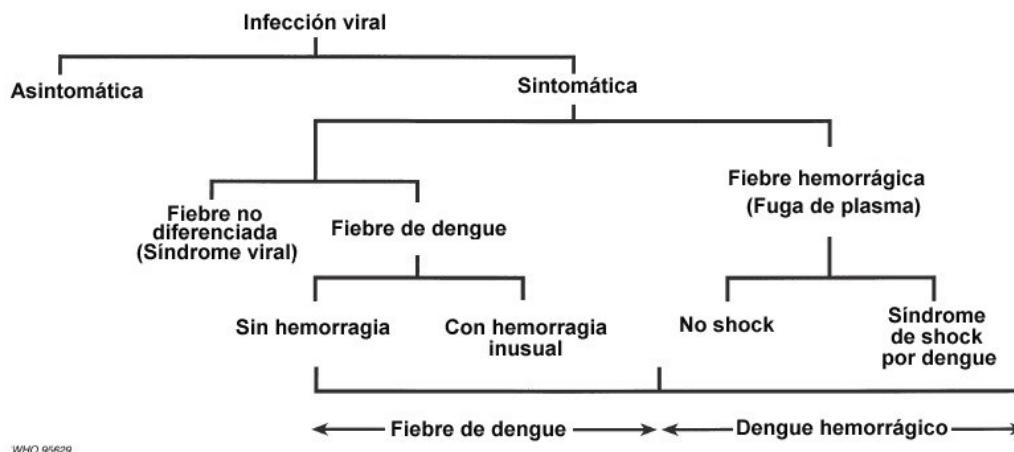


Figura 8. Manifestaciones clínicas del dengue.⁶⁴

En la *fase febril* el paciente típico presenta fiebre repentinamente y coincide con el aumento en la viremia sistémica. Esta fase febril aguda generalmente dura de 2 a 7 días y se acompaña de enrojecimiento facial, eritema, dolor corporal generalizado, mialgia, artralgia y cefalea. Algunos pacientes pueden presentar irritación en garganta, faringe irritada, anorexia, náusea y vómito.¹⁰ Puede resultar difícil distinguir al dengue de otros padecimientos en la fase febril temprana. Una prueba de torniquete positiva en esta fase eleva las posibilidades de un diagnóstico correcto.

Es importante mencionar que la sintomatología descrita con anterioridad no permite distinguir entre casos de dengue severo y no-severo, por lo cual se requiere monitoreo continuo para distinguir señales de alarma y otros parámetros clínicos para reconocer la progresión hacia una fase crítica.^{10, 66}

Pueden aparecer manifestaciones hemorrágicas leves como aparición de petequias y sangrado de membranas mucosas (ejemplos: membranas nasales y encías). Puede ocurrir sangrado vaginal masivo y gastrointestinal pero no son comunes.⁶⁷ Se puede presentar hepatomegalia después de los primeros días del cuadro febril. La anormalidad más temprana en el recuento de células sanguíneas es una reducción progresiva en el número de



leucocitos, lo cual eleva las probabilidades de que el paciente tenga dengue.
10, 67

Durante el tiempo de defervescencia, cuando la temperatura disminuye a 37.5 - 38.0 °C o menos y permanece bajo este nivel, generalmente entre los días 3 y 7 de la enfermedad, puede ocurrir un incremento en la permeabilidad capilar en paralelo con el aumento en el hematocrito. Esto marca el inicio de la *fase crítica* y el periodo de fuga de plasma clínicamente significativo puede durar entre 24 y 48 horas.¹⁰

Una leucopenia progresiva seguida de un decremento rápido en el recuento plaquetario usualmente antecede a la fuga de plasma. En este punto los pacientes sin incremento en la permeabilidad capilar comenzarán a recuperarse, mientras aquellos con permeabilidad aumentada empeorarán, como resultado de la pérdida del volumen de plasma.¹⁰ El grado de fuga plasmática varía. Puede detectarse ascitis y efusión pleural dependiendo del volumen perdido y de la terapia de restitución de líquidos empleada, por lo que el empleo de rayos X de tórax y abdomen es útil para hacer un diagnóstico. El incremento del hematocrito a menudo refleja la severidad de la fuga de plasma.^{10, 68}

Cuando el volumen de plasma perdido es crítico puede ocurrir *choque de dengue*. A menudo se antecede por señales de alarma como temperatura corporal subnormal. La hipoperfusión orgánica resulta en daño progresivo, acidosis metabólica y coagulación intravascular diseminada, que se ven reflejados en un cuadro hemorrágico severo y una disminución dramática en el hematocrito.¹⁰ Pueden presentarse hepatitis, encefalitis y miocarditis.

Aquellos pacientes que mejoran después de la defervescencia son diagnosticados con dengue no severo. Algunos pacientes progresan a la fase crítica de fuga de plasma sin defervescencia, por lo que para hacer un



diagnóstico adecuado deben monitorearse los posibles cambios en el recuento hemático.^{3, 10}

Si el paciente sobrevive durante la fase crítica entre 24 y 48 horas, se puede presentar una reabsorción gradual del fluido del compartimiento extravascular en las siguientes 48 – 72 horas, comenzando la *fase de recuperación*. El estado general del paciente mejora, regresa el hambre, desaparecen los síntomas gastrointestinales, se estabiliza la hemodinamia y se retorna a una diuresis normal. Algunos pacientes pueden presentar rash y prurito. El hematocrito se estabiliza o se disminuye ligeramente por efecto del fluido reabsorbido.¹⁰

Sin embargo no todos los pacientes progresan con buen pronóstico hacia la fase de recuperación. La aparición de fuga de plasma, choque, acumulación de fluidos con o sin afección respiratoria, hemorragias severas y/o daño sistémico generalizado, son indicativos de que el paciente cursa con un cuadro de *dengue severo* y deben considerarse como señales de alarma.⁶⁹

Mientras progresa la permeabilidad vascular, la hipovolemia empeora. Generalmente sucede entre el día 4 y 5 de la enfermedad y durante la etapa inicial del choque, el mecanismo compensatorio que mantiene una presión sanguínea sistólica normal, ocasiona taquicardia y vasoconstricción periférica con perfusión epitelial reducida.^{10, 70}

Pacientes con dengue severo pueden tener anomalías en la coagulación, pero no son suficientes por sí solas para causar hemorragias masivas.^{10, 67} Cuando no se presenta el cuadro hemorrágico generalmente se asocia el cuadro con choque profundo, ya que en combinación con la trombocitopenia, hipoxia y acidosis puede ocasionarse falla orgánica múltiple y coagulación intravascular diseminada avanzada.

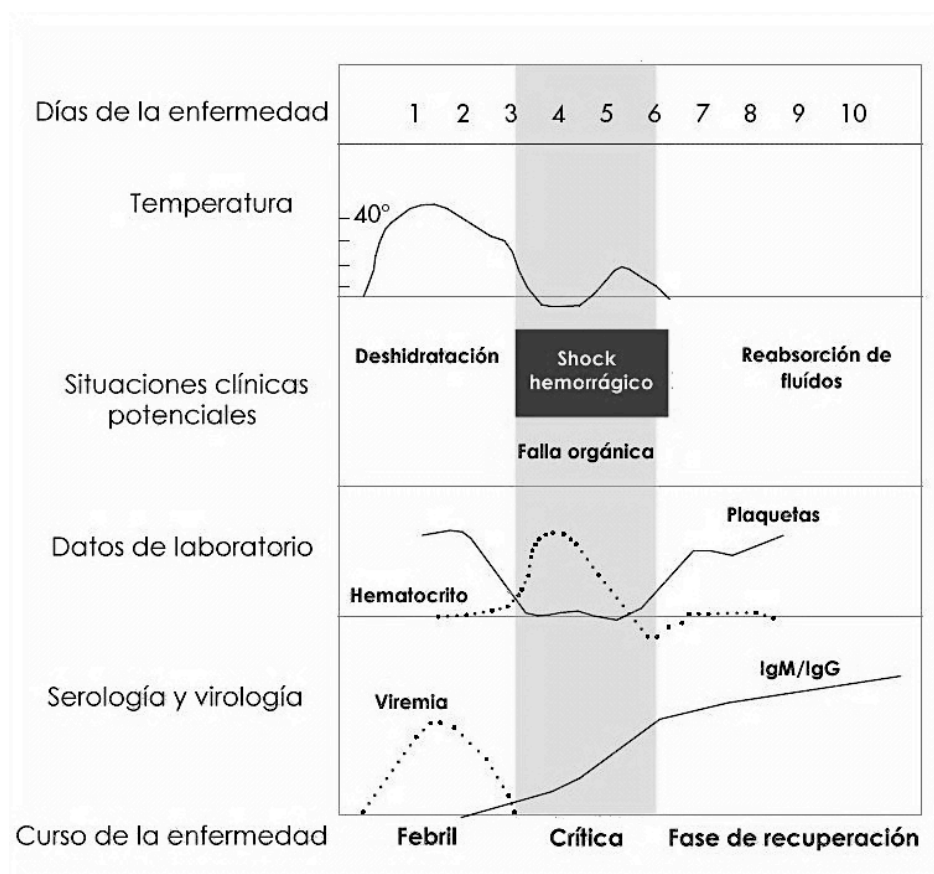


Figura 9. Historia clínica del dengue. ¹⁰

El sangrado masivo puede ocurrir en pacientes tratados con ácido acetilsalicílico, ibuprofeno o corticosteroides.^{10, 68} Las manifestaciones inusuales, incluyendo la falla hepática aguda y encefalopatía pueden presentarse, incluso en ausencia de fuga de plasma severa o choque.⁵⁸ Se han reportado encefalitis y cardiomiopatía en algunos casos. Sin embargo, el mayor número de muertes de paciente con dengue ocurren en pacientes con choque profundo, particularmente si la situación se complica por el volumen de líquido acumulado.^{10, 70, 71} **(Figura 9)**

1.5. Diagnóstico diferencial

El diagnóstico eficiente y preciso del dengue es una necesidad primaria en el ámbito clínico. La detección temprana de casos, la confirmación y el

diagnóstico diferencial de otras enfermedades febriles son actividades importantes para el tratamiento adecuado de los pacientes, además de que se requieren como base para el monitoreo continuo de la diseminación de la enfermedad, control de brotes epidémicos, estudios académicos, así como para el desarrollo de vacunas y diseño de protocolos clínicos.⁷²

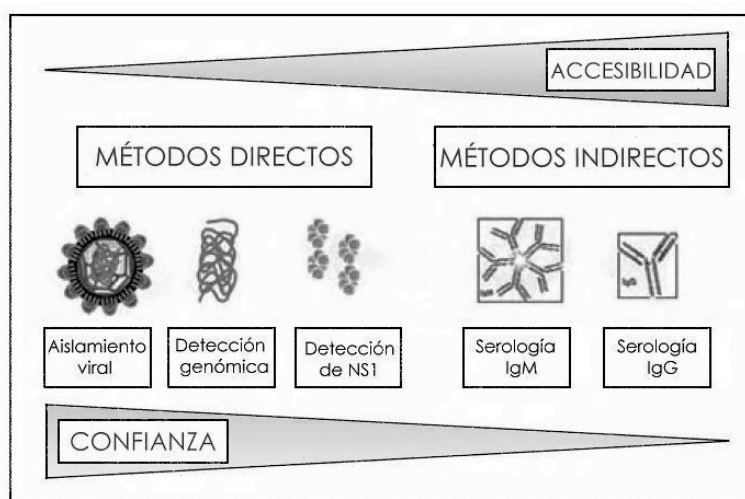


Figura 10. Esquema comparativo de los diferentes métodos de diagnóstico del dengue.¹⁰

Los métodos de laboratorio para el diagnóstico y confirmación del dengue pueden ser directos o indirectos. Los métodos directos son aquellos en donde se busca la presencia de la partícula viral ya sea detectando el genoma o antígenos de superficie del virión.¹⁰ Los métodos indirectos se basan en la detección de anticuerpos y permiten identificar entre infecciones primarias y secundarias. En general, las pruebas con alta sensibilidad y especificidad (directas) requieren tecnologías más complejas y mayor experiencia en el desarrollo de la técnica, mientras que las pruebas rápidas (indirectas) pueden tener sensibilidad y especificidad comprometidas pero el resultado se obtiene de forma rápida.¹⁰ **(Figura 10)**

Los métodos directos más empleados son el aislamiento viral, detección del genoma viral y de la proteína NS1.^{10, 12} Los métodos indirectos que se



emplean normalmente son serológicos y se basan en detecciones de IgG/IgM. La técnica a utilizar es dependiente del tiempo en el cual se requiere hacer la detección de la enfermedad. Durante las etapas iniciales se recomienda emplear métodos directos, mientras que para el final de la fase aguda se recomienda el uso de métodos indirectos.^{10, 12}

Antes del quinto día de la enfermedad, durante el periodo febril las infecciones pueden diagnosticarse por aislamiento viral en cultivo celular, estándar de oro para la confirmación de casos.^{10, 60} Es muy importante mantener las muestras congeladas para preservar la viabilidad de las partículas virales presentes durante su almacenamiento y transporte. Este proceso generalmente toma de 7 a 14 días.^{10, 73}

La detección de ácidos nucleicos permite la identificación y tipificación del RNA viral en un rango de 24 a 48 horas, pero requiere equipo y reactivos especializados y caros.^{74, 75, 76} En ambos casos, se requiere también de personal con experiencia en la técnica y el establecimiento de protocolos de control de calidad para evitar contaminación y resultados falsos.^{77, 78}

En la actualidad el uso de estuches comerciales para la detección de la proteína NS1 (como el NS1 Ag Dengue Platelia de Bio-Rad) se ha extendido a nivel mundial, puesto que permiten un análisis directo de forma rápida y pueden trabajarse en laboratorios con equipo e infraestructura limitados.^{79, 80} Posterior al quinto día, las partículas y antígenos virales desaparecen del torrente sanguíneo, coincidiendo con la aparición de anticuerpos específicos, permitiendo el empleo de métodos serológicos para diagnosticar la infección.⁶⁸

Para las técnicas serológicas el transporte y almacenamiento de muestras, así como el tiempo de colecta de la muestra son más flexibles.¹⁰ Se recomienda que las muestras se mantengan a 4 °C para evitar la posible



degradación de los anticuerpos, aunque estos son estables a temperatura ambiente.^{10, 81}

Cuando la infección por dengue ocurre en un paciente que no había sido previamente inmunizado con un Flavivirus o con una vacuna contra alguno de ellos, se desarrolla una respuesta inmune primaria caracterizada por un aumento lento en la concentración de anticuerpos específicos.^{10, 82}

Los anticuerpos de tipo IgM son los primeros en aparecer y son detectables en el 50% de los pacientes de 3 a 5 días después de la aparición de la sintomatología, en el 80% al día 5 y en el 99% al día 10, alcanzando su máximo a las dos semanas después del inicio del cuadro sintomático y disminuyendo a niveles indetectables de dos a tres meses después.^{10, 81}

El IgG anti-dengue en suero se detecta en bajos títulos al final de la primera semana de la enfermedad, incrementando lentamente y lográndose hallar en suero probablemente durante toda la vida del paciente.⁸³ Durante una infección secundaria, aquella en donde el paciente ya ha cursado antes con dengue o ha sido previamente inmunizado con vacunas, el título de anticuerpos se eleva rápidamente y reacciona de forma cruzada contra múltiples Flavivirus.⁸⁴

El isotipo de anticuerpo dominante es IgG, detectable en altas concentraciones incluso en la fase aguda y persiste desde 10 meses hasta toda la vida del paciente. Los niveles de IgM son tan bajos en estos casos que llegan a ser indetectables, por lo que actualmente para diferenciar entre infecciones primarias y secundarias se usan cocientes IgM/IgG. Una infección se califica como secundaria cuando los títulos de IgG son al menos 45 veces más altos que los de IgM antiDENV.^{84, 85}



Método	Diagnóstico de infección aguda	Tiempo para obtención del resultado	Espécimen	Tiempo para colecta de muestra*	Infraestructura y equipo	Costo
Aislamiento viral y serotipificación	Confirmado	1-2 semanas	Sangre completa, suero, tejido	1-5 días	Laboratorio BSL-2/BSL-3, cuarto de cultivo, líneas celulares permisibles, microscopio de fluorescencia, equipos para biología molecular	\$\$\$
Detección del genoma viral	Confirmado	1-2 días	Tejidos, sangre completa, suero, plasma	1-5 días	Laboratorio BSL-2 y equipo para biología molecular	\$\$\$
Detección de NS1	No determinado	1 día	Suero	1-6 días	Equipo para ELISA	\$\$
Detección antigénica	Confirmado	> 1 día	Tejido para inmunohistoquímica	No aplica	Equipo para histología	\$\$\$
IgM ELISA	Probable	1-2 días	Suero, plasma, sangre completa	> 5 días	Equipo para ELISA	\$
Test rápido IgM		30 minutos			No se requiere infraestructura adicional	
IgG con sueros pareados	Confirmado	7 días o más	Suero, plasma, sangre completa	Fase aguda: 1-5 días;	Equipo para ELISA	\$
Inhibición de la hemaglutinación				Fase convalescente: > 15 días	Laboratorio BSL-2	

* después de la aparición de la sintomatología en el paciente.

Tabla 4. Comparación de las técnicas para diagnóstico del dengue más usadas.¹⁰

Los métodos serológicos tienen la ventaja de permitir la comparación entre muestras del mismo paciente obtenidas durante la fase aguda de la enfermedad contra muestras colectadas semanas o meses después. Un incremento de 4 veces en los niveles de IgG por ELISA o inhibición de la hemaglutinación indica una infección aguda o reciente. Sin embargo, el esperar para la obtención del suero de un paciente convaleciente no es útil para el diagnóstico y el manejo clínico y sólo es útil para la realización de análisis retrospectivos.⁸⁵



El método de diagnóstico depende por lo tanto de múltiples variables. La **Tabla 4** muestra los métodos más empleados actualmente, sus ventajas y desventajas, mostrando que no todas son tan asequibles, precisas e infalibles como pudiéramos pensar.

Nuevas estrategias se han ido desarrollando con el paso del tiempo, como los inmunoensayos basados en microesferas, microarreglos y técnicas basadas en inmunoluminiscencia.⁸⁶ Sin embargo no se encuentran disponibles más que a nivel de investigación y desarrollo, no siendo aptas para su utilización en el ámbito clínico todavía.^{87, 88}

1.6. Tratamiento

Actualmente no existe un tratamiento específico para la infección por el virus del dengue. El manejo clínico del paciente requiere el control de la sintomatología presente, con estrategias que pueden ir desde el aumento en la ingesta de líquidos hasta la hospitalización. La admisión del paciente en el hospital es dependiente de la presencia de señales de alarma.

No se deben administrar antiinflamatorios no esteroideos (AINES) para no elevar las probabilidades de evolución hacia cuadros hemorrágicos. Durante la fase de recuperación la restitución de líquidos debe detenerse para prevenir la sobrecarga de fluidos.^{89, 90, 91} El tratamiento a seguir definido por la SSA dependiendo del caso de dengue que presente el paciente se muestra en la **Tabla 5**.¹¹



Forma clínica de la infección por DENV	Tratamiento
Fiebre de dengue	Hidratación oral; Acetaminofen 10-15 mg/ 6 horas. Evitar AINES. Informar al paciente y a la familia sobre los signos clínicos a observar. Realizar prueba de torniquete. Vigilar sangrados y signos de alarma.
Pacientes con fiebre y petequias	Tratamiento local compresivo si hay sangrado de mucosas. Hematocrito y recuento plaquetario seriado cada 12 horas y buscar hemoconcentración. Vigilar sangrados mayores: Hematemesis, hematoquesia, melena. Vigilar signos de fuga capilar, ascitis o hidrotórax por clínica, ultrasonido o rayos x. Vigilar la aparición de señales de alarma.
Pacientes con señales de alarma	Infusiones intravenosas con soluciones cristaloides. Monitoreo clínico cada hora y de laboratorio cada 8. Vigilar cianosis (oxigenoterapia). Vigilar aparición de signos preliminares de choque (estrechamiento de la presión y pulso). Consideración de peligro inminente de choque para tratamiento precoz.
Pacientes con signos de choque	Canalización de venas. Infusiones intravenosas con soluciones cristaloides. Oxigenoterapia. Vigilar hematemesis y hemorragia pulmonar. Si fuese necesario, transfundir plaquetas o sangre recién extraída. Vigilar dificultad respiratoria. Prevención del edema pulmonar. Si es necesario, dar ventilación mecánica y evitar traslado de pacientes hemodinámicamente inestables.

Tabla 5. Tratamiento recomendado por la SSA para el paciente con dengue.¹¹

Para una enfermedad que es compleja en sus manifestaciones, el manejo del paciente es considerablemente sencillo, barato y efectivo siempre y cuando el médico logre dar un diagnóstico temprano y se realicen las acciones adecuadas en el tiempo correcto.¹⁰ La clave es el reconocimiento temprano y el entendimiento del cuadro clínico durante las diferentes fases de la enfermedad, para lograr una aproximación racional del caso y obtener un buen pronóstico clínico.

El control de la transmisión de la enfermedad se realiza tratando de limitar la presencia del vector en comunidades urbanas empleando insecticidas y concientizando a la población en general para la eliminación adecuada de basura y erradicación de reservorios de agua.⁹²



El dengue es una prioridad de salud pública nacional, debido a los efectos sociales y económicos inmediatos que puede ocasionar, por los daños a la salud en grandes grupos de población expuesta y, entre otras razones, por el exceso en la demanda de consulta y los costos de atención que conlleva la prestación de los servicios para las instituciones, las familias y la comunidad.

La protección ante los riesgos de transmisión en la población es un factor importante para evitar su diseminación; sin embargo, es indispensable contar con la participación total y decidida de la sociedad, municipios y los propios servicios de salud de todas las instituciones del Sector Salud, para operar los programas con mayor eficiencia y contener así la tendencia ascendente del dengue en México.^{8, 92}

Las acciones de prevención y control de los programas estatales de dengue se llevan a cabo por las diversas instituciones del sector y otros organismos de salud que atienden a los distintos segmentos de la población, bajo un esquema de organización que se enmarca en el Programa de Acción del Sector Salud.⁸

Si bien existen ejes rectores que definen la orientación y criterios para el funcionamiento del mismo en todos sus componentes, se requiere de un mayor nivel de integración de las instituciones de salud y otras dependencias públicas y privadas afines, en las que se detectan y reconocen rezagos para su incorporación efectiva a las acciones de lucha contra el dengue.^{8,11}

Las instituciones de Seguridad Social se encargan de atender entre cinco y seis de cada diez mexicanos, en tanto la Secretaría de Salud y otras instituciones de población abierta, brindan atención médica al resto de la población y sólo una proporción menor se atiende en instituciones privadas; a pesar de ello, los servicios de la Secretaría de Salud en los estados, son



los que reciben la mayor demanda de consultas y hospitalización por dengue.⁸

1.7. Profilaxis

No hay vacuna que proteja totalmente contra el dengue. Sin embargo, se han registrado grandes progresos en ese sentido, tanto contra el dengue como el dengue grave. Se están elaborando tres vacunas vivas atenuadas tetravalentes que se encuentran en fase II y fase III de los ensayos clínicos, y hay varias vacunas candidatas (basadas en plataformas de subunidades, ADN y virus inactivado purificado) en etapas más tempranas de la investigación clínica.

La OMS brinda asistencia técnica y orientación a los países y asociados privados para apoyar las investigaciones y evaluaciones en torno a una vacuna. Varias vacunas candidatas se encuentran en ensayos de diversas fases. (**Tabla 6**)^{93, 94, 95}

En la actualidad, el único método para controlar o prevenir la transmisión del virus del dengue consiste en luchar contra los mosquitos vectores¹⁰⁷:

- Evitar que los mosquitos encuentren lugares donde depositar sus huevecillos aplicando el ordenamiento y la modificación del medio ambiente.
- Eliminar correctamente los desechos sólidos y los posibles hábitats artificiales.
- Cubrir, vaciar y limpiar cada semana los recipientes donde se almacena agua para uso doméstico.
- Aplicar insecticidas adecuados a los recipientes en que se almacena agua a la intemperie.



COMPANÍA DE DESARROLLO	FASE CLÍNICA	DESCRIPCIÓN	REF
Sanofi Pasteur	3	A la fecha realiza múltiples pruebas Fase 3 para su vacuna tetravalente quimérica viva atenuada , desarrollada empleando el esqueleto del virus de la fiebre amarilla en Australia y varios países de Asia y América latina.	95 97 98
Centro de Investigación Médico- Naval (U.S.A.)	1	Completaron una evaluación fase 1 'proof of concept' para su vacuna plasmídica de DNA contra DENV1 . 5 de los 12 recipientes de la vacuna de dosis alta desarrollaron anticuerpos neutralizantes contra DENV1. Se encuentra en proceso de reformulación con un nuevo adyuvante (Vaxfectina)	95 98 99
Institutos Nacionales de Salud (NIH, U.S.A.)	1	Evaluaron diferentes vacunas monovalentes candidatas para seleccionar aquellas con los mejores perfiles de seguridad e inmunogenicidad. TV003, la vacuna tetravalente elegida para continuar la evaluación, comenzará su fase 2 en niños y adultos en zonas endémicas de Tailandia.	95 98 99
Biological E (India)	Preclínica	Se encuentran evaluando su vacuna tetravalente viva atenuada (licenciada por NIH) para definir su estrategia de desarrollo clínico.	95 98
Butantan (Brasil)	2	Han producido lotes de su vacuna tetravalente viva atenuada (licenciada por NIH). Han recibido aprobación para comenzar evaluación en fase 2 de su producto en población general no expuesta a flavivirus y en adultos expuestos a flavivirus.	95 98 100
Panacea Biotech (India)	Preclínica	Han producido diferentes lotes de su vacuna tetravalente viva atenuada (licenciada por NIH) y completado estudios de estabilidad para su formulación.	95 98
Vabiotech (Vietnam)	Preclínica	Comenzó con la producción de lotes de semilla monovalente para la generación de una vacuna tetravalente viva atenuada (licenciada por NIH). Cuando sus lotes pasen pruebas de seguridad, formularán la vacuna. Actualmente se encuentran desarrollando su plan de estudios clínicos.	95 98
Inviragen (Adquirido por TAKEDA)	2	Comenzó con pruebas clínicas de fase 2 en Puerto Rico, Colombia, Singapur y Tailandia para su vacuna tetravalente viva atenuada . Aunado a esto, se encuentran estudiando estrategias rápidas de inmunización y administración de la vacuna sin necesidad de agujas.	95 98 101 102
Merck	1	Han completado una prueba fase 1 'proof of concept' de la vacuna con subunidades proteicas recombinantes que usa alúmina como adyuvante, desarrollada en Hawaii Biotech. Están llevando a cabo una prueba fase 1 de la vacuna tetravalente con ISCOM como adyuvante en Australia.	95 98 103 104
Glaxosmithkline	1	Pruebas fase 1 'proof of concept' de una vacuna purificada inactivada , originalmente desarrollada por el instituto Walter Reed Army for Medical Research (U.S.A.) y evaluando nuevas vías de administración (fase 1). Convenio de investigación para desarrollar esta vacuna en conjunto con la Fundación Oswaldo Cruz en Brasil.	95 98 105 106

Tabla 6. Fases de desarrollo de múltiples vacunas contra el dengue.⁹⁵



- Utilizar protección personal en el hogar, como mosquiteros en las ventanas, usar ropa de manga larga, materiales tratados con insecticidas, espirales y vaporizadores.
- Mejorar la participación y movilización comunitarias para lograr el control constante del vector.
- Durante los brotes epidémicos, las medidas de lucha antivectorial de emergencia pueden incluir la aplicación de insecticidas mediante el rociamiento.
- Se debe vigilar activamente los vectores para determinar la eficacia de las medidas de control.¹⁰⁷

1.8. Búsqueda de posibles blancos terapéuticos a nivel de investigación

Para poder desarrollar un tratamiento efectivo contra el virus, se requiere comprender la forma en la cual este agente con su limitado genoma y sus 10 proteínas, es capaz de secuestrar la maquinaria celular para poder utilizarla a su favor y replicarse. El entendimiento del mecanismo de entrada y de replicación viral en la célula hospedera es la clave para la identificación de potenciales blancos terapéuticos.

Como se ha hecho con otros virus como el VIH-1 o el VHC, la base para estos estudios es el análisis de los genes tanto virales como del hospedero que participan en el proceso, su sub-expresión, sobre-expresión o silenciamiento. El desarrollo de antivirales requiere del conocimiento del ciclo de replicación del virus en la célula huésped así como las características estructurales y funcionales de las proteínas virales, a fin de hallar los blancos más adecuados para bloquear la infección.^{108, 109, 110}

A nivel mundial se han realizado numerosas investigaciones destinadas a la comprensión de los procesos moleculares de replicación del RNA del virus



del dengue y otros flavivirus.¹¹¹ Sin embargo, a la fecha no existe un modelo ilustrativo que resuma de manera general toda la información obtenida sobre los procesos de replicación del RNA del virus del dengue.¹¹²

A lo largo del ciclo de replicación viral se han identificado varios puntos que pudieran servir como objeto de estudio y resultar en potenciales tratamientos antivirales, entre ellos: Inhibidores de la síntesis de RNA, de la proteasa y de la fusión de membranas; maduración: inhibidores de α -glucosidasa, inhibición a nivel de la expresión génica.¹¹³ Los estudios no se enfocan exclusivamente en genes únicos, sino en el rol que juegan en vías de señalización intra y extracelular, desde la interacción de la partícula viral con su receptor hasta la liberación de los viriones nuevos.

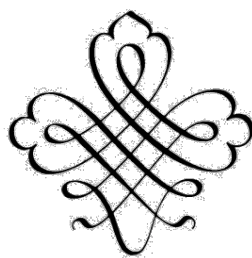
El número de casos complicados de dengue continúa aumentando en las áreas endémicas a nivel mundial, por lo cual el desarrollo de una vacuna efectiva debe convertirse en una prioridad de salud pública global.^{10, 11} Existen reportes experimentales en animales que analizan un modelo experimental adecuado en animales de laboratorio, sin embargo siguen en controversia, ya que para establecer los protocolos de infección e inmunización a la fecha ha sido difícil de reproducir.¹¹⁴

Aunque la vacuna se encuentra bajo investigación y aunque los resultados parecen ser prometedores y muy avanzados en los últimos cinco años, todavía tomará tiempo obtener profilaxis efectiva contra los cuatro serotipos virales que sea asequible y que provea protección a largo plazo.^{115, 116, 117}

La OMS por su parte brinda asistencia técnica y orientación a los países y asociados privados para apoyar las investigaciones y evaluaciones en torno a una vacuna realizando y promoviendo tareas como:



- Apoyo técnico y orientación a los países y para el control eficaz de las epidemias de dengue;
- Apoya a los países para que confirmen los brotes por medio de la red de laboratorios colaboradores;
- Ayuda a los países a mejorar sus sistemas de notificación y a determinar la verdadera carga de morbilidad del dengue;
- Junto con algunos de sus centros colaboradores ofrece capacitación sobre el tratamiento clínico, el diagnóstico y la lucha antivectorial en el plano regional;
- Formula estrategias y políticas basadas en datos científicos;
- Apoya la elaboración de instrumentos nuevos como productos insecticidas y la tecnología para su aplicación;
- Reúne los registros oficiales de dengue y dengue grave de más de 100 países miembros;
- Publica periódicamente directrices y manuales para la prevención y el control del dengue que distribuye a los Estados Miembros.¹⁰⁷



CAPÍTULO II

ANTECEDENTES



2.1 Antecedentes directos

En nuestro grupo de estudio se realizó un estudio en un grupo de donadores en un hospital de concentración de tercer nivel del Noreste del país, en donde se reportó que existe un 2% de donadores que presentan anticuerpos contra el DENV al momento de realizar la donación sanguínea, lo cual podría representar un alto riesgo de contraer la infección para los pacientes.¹¹⁸

Por otra parte, en un estudio seroepidemiológico del Virus del oeste del Nilo y virus del Dengue a finales del 2009, nuestro grupo de investigación demostró que el VON y el DENV conviven en el norte del país (evidencia serológica de anticuerpos). También se encontró que un alto porcentaje de la población ha estado expuesto al DENV ya que en la población estudiada del 58 al 67 % de los individuos presentaron evidencia de exposición previa al DENV. Mediante pruebas específicas (pruebas de PRNT) se evidenció que el 41% de las muestras analizadas fueron seropositivas para el DENV-1 y 15% fueron positivas para el DENV-2.¹¹⁹ Estos resultados concuerdan con estudios realizados en el 2004 en las ciudades fronterizas. Finalmente en ese estudio llegamos a la conclusión que la principal razón de la ausencia de casos anuales del VON en humanos en el Noreste de México es que una gran proporción de la población estudiada ha sido infectada con el DENV y por lo tanto son resistentes o menos susceptibles a padecer una infección severa por el VON.¹¹⁹



Sabemos que un problema evidente con este tipo de infecciones reemergentes es que actualmente no existe una vacuna contra el DENV, ni fármacos antivirales específicos, por lo que enfocados en este raciocinio, queremos dirigirnos un paso más adelante de solo conocer la seroepidemiología del DENV en nuestro país.^{120, 121, 122}

Dentro de este nuevo enfoque nos interesa conocer cuáles son los mecanismos implicados en la replicación del DENV (serotipos 1-4) que circulan en nuestro país, qué mecanismos celulares “aprovecha el virus” para realizar su ciclo de replicación, cómo podría modificarse o bloquearse este ciclo, etc., haciendo énfasis en los mecanismos de evasión de la respuesta de interferón tipo I para posteriormente evaluar diversas posibilidades que impliquen “moléculas o proteínas” imprescindibles en los procesos de infección y replicación para identificar probables blancos terapéuticos contra este virus.

2.2. Patogénesis de la variabilidad en la presentación clínica del dengue

Una de las características de la infección con DENV, es la alta variabilidad en la presentación del cuadro clínico¹²³. No todos los pacientes presentan una infección sintomática, algunos cursan con un cuadro febril autolimitado y otros evolucionan a cuadros severos que pueden culminar con la muerte del sujeto¹²⁴. Diversos grupos de investigación se han dado a la tarea de entender la patogénesis del dengue, encontrando que se trata de un proceso multifactorial donde el hospedero juega un rol primordial en la presentación del cuadro clínico.¹²⁵

Los trabajos publicados señalan que la severidad en el cuadro clínico de dengue parece estar relacionada a la intensidad de la respuesta de interferón, sirviendo incluso como factor predictivo¹²⁶. En los pacientes que cursan con cuadros severos de dengue, el cuadro sintomático parece estar



ligado a la presencia de una tormenta de citocinas, entre ellas los interferones¹²⁷.

2.3. Interferón

Los interferones (IFN) son proteínas producidas por el sistema inmune como respuesta a la presencia de patógenos externos, especialmente frente a infecciones virales.¹²⁸ Se trata de glicoproteínas de la clase de las citocinas que tienen la capacidad de interferir (de ahí el origen de su nombre) con la replicación viral en células infectadas. Fueron descritos en 1954 por Yasuichi Nagano y Yasuhiko Kojima, aunque fue hasta 1957 que Alick Isaacs y Jean Lindenmann acuñaron el término 'interferón'.^{129, 130} Se han descrito diez diferentes tipos de IFN en mamíferos, los cuales se han dividido en tres clases o tipos:

Existen tres clases de interferón:

- a) **Interferón tipo I.** Esta clase está compuesta por 14 diferentes isoformas del IFN- α e isoformas individuales IFN- β , IFN- ϵ , IFN- ω e IFN- κ . Todos los IFN tipo I se unen a un receptor de membrana conocido como receptor IFN- α/β (IFNAR), el cual es un heterodímero formado por dos cadenas (IFNAR1 e IFNAR2).¹³¹ En general los IFN tipo I se producen como respuesta a infecciones virales y son secretados por fibroblastos, monocitos, macrófagos, Linfocitos T, B, células NK y células endoteliales. La producción de IFN tipo I se bloquea por efecto de IL-10.¹³²
- b) **Interferón tipo II.** Constituida por el IFN γ . Se le conoce como interferón inmune y se activa por IL-12.¹³² El IFN tipo II es secretado por fibroblastos, linfocitos T activados: T auxiliares (T helper) tipo 1 y bloquean a su vez la proliferación de células T auxiliares tipo 2, inhibiendo la respuesta inmune Th2 y promoviendo la respuesta Th1.



Los IFN tipo II se unen al receptor IFNGR, el cual consiste en un heterodímero formado por dos cadenas (IFNGR1 e IFNGR2).¹³²

- c) Interferón tipo III.** Tres isoformas del IFN- λ : IFN- λ 1, IFN- λ 2 e IFN- λ 3. No se encuentra estructuralmente relacionado al IFN tipo I.¹³³ Estos interferones señalizan vía un complejo de receptores formados por IL10R2 (CRF2-4) e IFNLR1 (CRF2-12).¹³⁴

Los interferones actúan como agentes antivirales, antitumorales (antiproliferativos), moduladores del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) y de la actividad del proteosoma, factores de activación de células inmunes, moduladores del reconocimiento antigénico en linfocitos T y principalmente como factores en procesos de transducción de señal y activadores transcripcionales.^{135, 136, 137}

2.4. Respuesta de interferón e inducción del estado antiviral

El interferón se produce como respuesta a la presencia de patógenos y sus metabolitos o productos.¹³¹ Las células infectadas por virus deben montar una respuesta de interferón efectiva para poder contrarrestar y eliminar al patógeno infectante, ocasionando el encendido de los genes de respuesta antiviral.¹³⁵

Los interferones clase I son parte de nuestra primera línea de defensa contra infecciones virales. Cuando un virus se internaliza a una célula (sin importar si lo hace por interacción con receptor, endocitosis o cualquier otro mecanismo), la replicación inicia en el momento que el genoma viral se encuentra libre en citoplasma.¹³⁸ Las helicasas RIG-1 detectan el RNA externo y activan a la proteína TBK-1, la cual a su vez fosforila a los factores reguladores de interferón IRF-3 e IRF-7. El complejo TBK-1/IRF-3 se trasloca al núcleo celular, para activar la producción de interferón. La célula

infectada además de liberar nuevos viriones, secreta IFN a las células vecinas para comunicar la presencia de la infección viral.¹³⁹ (Figura 11)

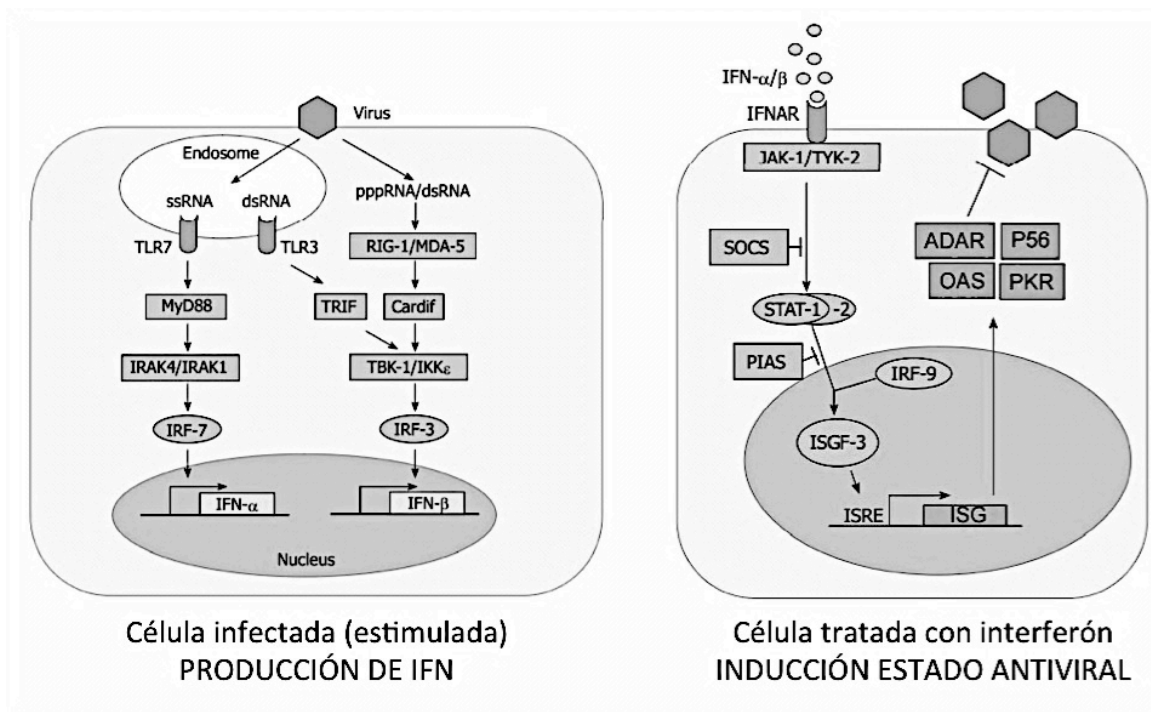


Figura 11. Mecanismo de inducción de interferón e inducción del estado antiviral.¹⁴⁰

El interferón liberado por la célula infectada interactúa con su receptor (IFNAR 1 y 2) en las células vecinas, el cual es parte de la vía de señalización JAK-STAT. La activación del receptor fosforila a las proteínas Jak-1 y Tyk-2, las que a su vez fosforilan a STAT-1 y STAT-2. STAT-1 y STAT-2 fosforilados tienen la capacidad de dimerizar y generar un complejo con IRF-9 denominado ISGF-3, el cual se trasloca al núcleo para interactuar con una secuencia en el DNA genómico denominada ISRE (elemento de respuesta a interferón), el cual es un elemento en cis que forma parte del promotor de los ISG (genes estimulados por interferón), los cuales codifican para una familia de más de 100 proteínas efectoras con diferentes actividades antivirales^{139,140,141} (Tabla 7).



ISG	NOMBRE	FUNCIÓN	REFS
OAS1	2'-5'- oligoadenilato sintasa	Modula la degradación del RNA viral, activando la RNasa L.	142
MX1 (MX A)	Proteína Mx1 de unión a GTP inducida por interferón	GTPasa relacionada con la transcripción viral por formación de oligómeros	142 143
ADAR	Adenosina desaminasa específica de RNA de doble cadena	Induce mutaciones en el RNA viral, suprime PKR.	142 143
EIF2AK2 (PKR)	Proteínquinasa R	Induce la inhibición de la síntesis proteica viral, marcando a EIF2A.	144
BST2	Teterina	Bloquea la liberación de viriones nuevos	145 146
IFIH1 (MDA5)	Proteína 5 asociada a diferenciación de melanoma	Detección de RNA viral, activación de IRFs	147
IRF1	Factor regulador de interferón 1	Inducción directa de IFN y activación de ISG	143 148 149
IRF7	Factor regulador de interferón 7	Inducción directa de IFN y activación de ISG	143 150 151
DDX58 (RIG-1)	Gen 1 inducible por ácido retinoico	Detección de RNA viral, activación de IRFs	147 152
IFITM 1	Proteína transmembrana 1 inducida por interferón	Desconocido, posiblemente marca la vía endocítica	153
RSAD2	Viperina	Altera las balsas lipídicas, promueve señalización por TLR 7/9	154 155
ISG20	Proteína estimulada por interferón de 20 KDa	Actividad de exonucleasa	156

Tabla 7. Ejemplos de algunos genes estimulados por interferón (ISG) y su función.¹⁴¹

2.5. Mecanismos de evasión de la respuesta antiviral

Para poder llevar a cabo un ciclo de replicación exitoso, los virus presentan diferentes mecanismos para evadir la respuesta antiviral innata estimulada por la producción de interferón. Los mecanismos existentes son muy variados y van desde la síntesis de receptores de IFN no funcionales

(señuelos), interrupción en la transducción de señales y disrupción de vías de señalización, bloqueo de la producción de interferón e incluso la síntesis de moléculas inhibitoras o antagonistas de los ISG¹⁵⁷ (**Tabla 8**).

MECANISMO	EJEMPLOS
Inhibición de IFN por unión a receptores falsos (señuelo)	<ul style="list-style-type: none"> • Poxvirus: Codifican receptores señuelo inactivos para IFN tipo I y tipo II.
Inhibición de la producción de IFN	<ul style="list-style-type: none"> • Papilomavirus humano: Codifica la proteína E6 que se une a IRF-3, bloqueando la producción de IFN. • Hepatitis C (HCV): Bloquea la activación de IRF-3 inhibiendo MAVS. • Virus del oeste del Nilo (WNV): Bloquea la activación de IRF-3.
Inhibición de la vía JAK-STAT	<ul style="list-style-type: none"> • Adenovirus: E1A reduce los niveles de STAT-1 y p48. • Ébola: Bloquea la señalización de IFN por mecanismo desconocido. • Citomegalovirus humano (CMV): Reduce los niveles de Jak-1 y p48. • Herpes virus (HPV): La proteína E7 se une a p48. • Virus de la encefalitis japonesa (JEV): NS5 previene la fosforilación de Tyk-2 y STAT-1. • Virus de la fiebre amarilla (YF): NS4B previene la activación de STAT-1.
Inhibición de enzimas antivirales inducidas por IFN	<ul style="list-style-type: none"> • Virus de la hepatitis B (HBV): La proteína de la cápside inhibe la expresión del gen MxA. • Virus de la encefalomiocarditis: Induce un inhibidor de RNasa L. • Virus Herpes Simplex: Codifica antagonistas de la 2'5' OAS.

Tabla 8. Mecanismos de evasión de la respuesta de IFN que presentan algunos virus (Adaptado de Umareddy, 2007).¹⁵⁷⁻¹⁶³

2.6. Dengue e interferón

Se ha descrito que la infección con el DENV, de forma similar a otros flavivirus, tiene la capacidad de modular la respuesta de interferón en las células hospederas.¹⁶⁵ La figura 12 muestra el mecanismo general mediante el cual de forma simultánea a la replicación viral, la inducción de interferón y

por consecuencia de la activación del estado antiviral intracelular, se ve reducida por acción del DENV.

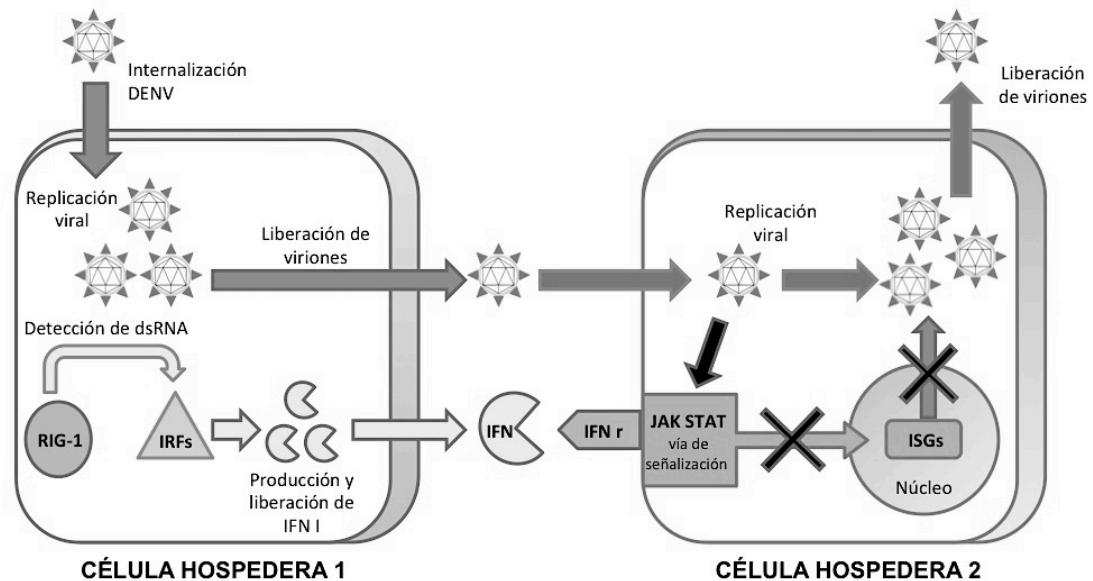


Figura 12. Mecanismo general de la evasión de la respuesta de IFN que presenta el virus del dengue.

Jones y colaboradores reportaron que el DENV puede inhibir la señalización de IFN α reduciendo la expresión de STAT-2. Transfectaron líneas celulares con replicones subgenómicos de dengue y observaron una disminución en la expresión de genes inducidos por IFN, describiendo específicamente el efecto sobre la disminución en la abundancia de STAT-2 y STAT-2P.¹⁶⁶

A nivel intracelular, se ha definido que el DENV reduce la respuesta de interferón como consecuencia de la interacción de algunas proteínas no estructurales con elementos de la señalización por JAK-STAT (**Figura 13**)¹⁶⁷:

1. Modulación negativa en la fosforilación de STAT-1. Por actividad de NS2A/NS4A/NS4B¹⁶⁸
2. Bloqueo de la fosforilación de Tyk2.^{169,170}

3. Reducción en la producción de interferón mediada por la proteasa NS2B-3.¹⁷²
4. Reducción en la abundancia de STAT-2 al unirse con NS5, lo que ocasiona su ubiquitinación y degradación vía proteosomal.^{171,172}

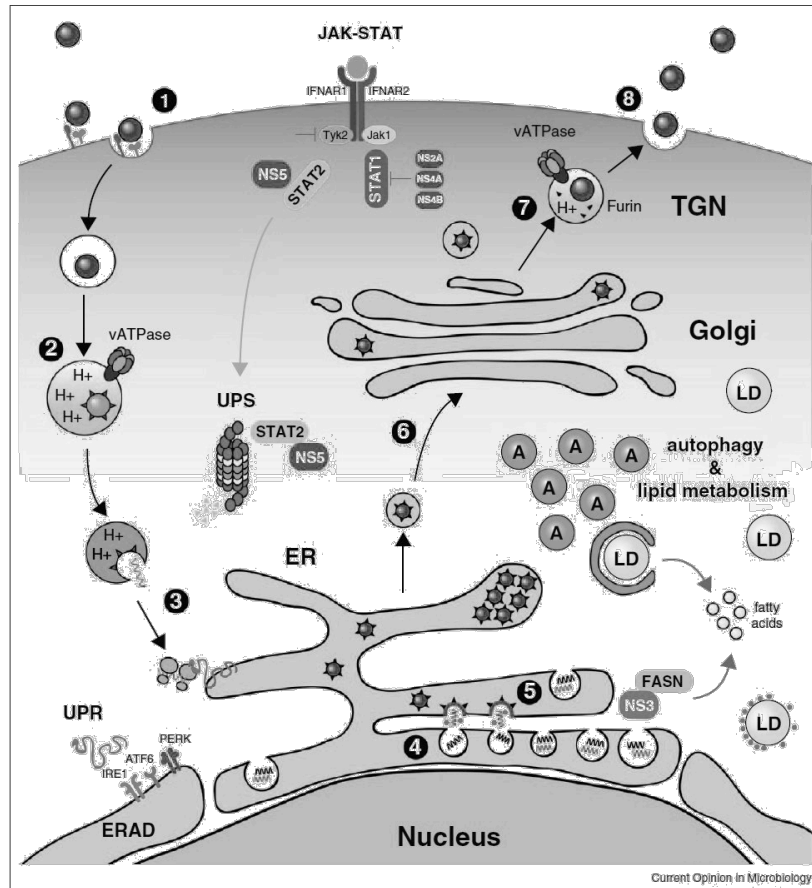


Figura 13. Actividad de las proteínas no estructurales del DENV sobre la señalización JAK-STAT para modular la respuesta de interferón.¹⁶⁷

Rodríguez-Madoz y colaboradores describieron que el DENV tiene la capacidad de inhibir la producción de Interferón tipo I en células dendríticas humanas y que el efecto podía revertirse con la adición de IFN β exógeno,¹⁶⁶ además identificó a la proteína no estructural NS2B3 como responsable de este fenómeno formando parte de un complejo con actividad de proteasa que tiene como sustrato a STING.^{172,173}



STING es una proteína mediadora de la activación de IRF-3 que interactúa con RIG-1 e IPS-1 pero no con MDA-5, participando en la fosforilación de TBK-1 y colocalizando en retículo endoplásmico. Se ha propuesto a IPS-1 como la proteína responsable del control de la replicación viral temprana, pero los resultados de este trabajo parecen indicar que la actividad de IPS-1 pudiese estar mediada por su interacción con STING, y que la proteasa NS2A3 del DENV es capaz de impedir dicha unión.¹⁷²

Umareddy y colaboradores^{173,174} describieron que la modulación en la señalización de interferón parece ser independiente del serotipo presente. Infectaron dos líneas celulares (A549 y HepG2) con dos cepas de DENV2 (NGC y TSV01) encontrando que inducían interferón tipo I en intensidad diferente e incluso activaban ISG's diferentes (EIF2AK2, OAS, ADAR y MX), evaluando por inmunofluorescencia, western blot y arreglos TaqMan de expresión. El análisis bioquímico reportó que la cepa NGC pero no TSV01 podía suprimir la activación de STAT-1 y STAT-2 en respuesta a IFN I (α y β), pero que ambas cepas no generaban una respuesta diferente a IFN tipo II (γ).¹⁷⁴

Adicionalmente compararon 5 aislados obtenidos a partir de pacientes virémicos (dos DENV-1, dos DENV-2 y un DENV-4) y observaron que dos aislados suprimían la respuesta de IFN similar al prototipo NGC, pero que los otros tres no tenían efecto sobre la respuesta de IFN. Estos hallazgos sugieren que la diferencia en la modulación de la respuesta de IFN parece ser dependiente de la cepa e independiente del serotipo de DENV infectante.¹⁷⁴

Los virus de RNA son agentes que se encuentran sujetos a una gran presión selectiva: Al poseer una RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) carente de actividad de corrección, en consecutivos ciclos de replicación se van acumulando mutaciones. El genoma viral debe mantener la secuencia



original sin cambios mayoritarios para poder completar el ciclo de replicación de manera exitosa.

Sin embargo, los cambios en la secuencia de otras regiones pudieran ser responsables de una mayor o menor capacidad infectiva o replicativa, al ocasionar cambios de aminoácidos que provean de una mayor o menor afinidad o actividad a las proteínas virales. Tahkampungnya y colaboradores evaluaron virus obtenidos a partir de sujetos asiáticos infectados. Realizaron secuenciación de ellos y mediante un análisis fenotípico, encontraron que los cambios en la secuencia de bases pudieran estar asociados a la capacidad de unión al receptor de internalización, replicación y modulación de la señalización de interferón.¹⁷⁵

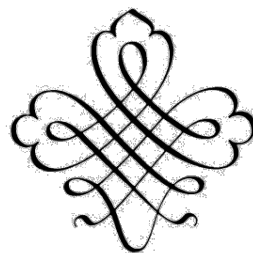
Sumado a la posible capacidad de las cepas para modular a diferentes magnitudes la respuesta de interferón¹⁷⁰, la variabilidad en el cuadro sintomático en los sujetos infectados con DENV parece estar relacionada a una regulación selectiva a la alta y a la baja de genes específicos.¹⁷⁶ La falta de estudios en pacientes asintomáticos limita los datos epidemiológicos reales de la enfermedad, siendo de importancia debido a que generalmente las infecciones primarias son asintomáticas en su mayoría.¹⁷⁷

A partir de una estrategia de comparación entre los niveles de anticuerpos neutralizantes en pacientes asintomáticos y perfiles de expresión por microarreglos, encontraron que había una regulación amplia a la baja de genes de respuesta a patógenos (respuesta innata, adaptativa y metaloproteasas de matriz) al comparar los perfiles de expresión contra pacientes sintomáticos.

Algunos genes regulados a la baja fueron : TNF α (TNF), IL8, C1S, factor B (CFB), IL2, IL3, IL4, IL5, IL8, IL9, IL10 e IL13, CD80, CD28, e IL18, MMP8, MMP10, MMP12, MMP15, MMP16, and MMP24. Algunos genes regulados a



la alta fueron: RANTES (CCL5), MIP-1 α (CCL3L1/CCL3L3), MIP-1 β (CCL4L1), TGF β (TGFB) y TIMP1.¹⁷⁰



CAPÍTULO III

JUSTIFICACIÓN



El dengue es un problema de salud mundial prioritario para todos los gobiernos de países afectados. Es importante considerar que el virus con sólo 10 genes propios, es capaz de dirigir y utilizar proteínas producidas por el organismo que infecta para completar su ciclo de replicación. Desde esta perspectiva es fundamental entender la relación existente entre el virus y el hospedero, para intentar modular a voluntad la replicación viral.

Actualmente la falta de estudios en pacientes asintomáticos es uno de los factores limitantes en los reportes de los casos de dengue, generándose un subreporte del panorama epidemiológico real a nivel mundial. En la mayoría de los casos las infecciones primarias son asintomáticas, generándose inmunidad al serotipo infectante. Esto sumado al desconocimiento del mecanismo de tropismo celular y el incompleto conocimiento de la cinética viral, genera un nicho de oportunidad en el área de investigación biomédica.

El estudio de los genes celulares involucrados en la evasión de la respuesta inmune celular (respuesta de interferón tipo I), permitiría a futuro desarrollar estrategias moleculares para detener o bloquear la proliferación del virus en el interior de las células huésped, generando posibles alternativas profilácticas y/o terapéuticas contra el dengue.

CAPÍTULO IV

OBJETIVOS



4.1. Objetivo general

Conocer la contribución epidemiológica e impacto del dengue en Nuevo León, así como establecer si existe una asociación entre la patogénesis y la variabilidad genética de los serotipos 1 y 2 del DENV, mediante la evaluación de los perfiles de expresión y respuesta a interferón, en cultivos celulares infectados con cepas virales aisladas a partir de sujetos mexicanos virémicos.

4.2. Objetivos específicos

1. Analizar los casos de dengue en el estado de Nuevo León para definir su impacto sobre el panorama epidemiológico nacional en el periodo 2008 – 2013.
2. Evaluar la presencia del DENV en una población centinela de residentes del estado de Nuevo León para identificar casos de infección sin presentación clínica.
3. Obtener, aislar, caracterizar y cuantificar partículas virales infectivas a partir de sujetos infectados con el DENV.
4. Evaluar si la infección de la línea celular Huh-7 con prototipos del DENV y con virus aislados de pacientes puede inducir una modulación diferencial de la vía de señalización del interferón.
5. Evaluar la expresión de los genes estimulados por interferón en el proceso de infección por el DENV.

CAPÍTULO V

MATERIALES



5.1. Lugar de realización

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Infectología Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como en el Laboratorio de Virología del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), unidad Zacatenco, México D.F.

5.2. Reactivos

Soluciones de uso general

- La limpieza de la zona de trabajo se realizó con solución al 10% de Dodecil sulfato de sodio (SDS; Marca USB. Cat. S5010); así como con etanol al 70% (Etanol desnaturalizado; marca Jaico, México), ambas en agua ultrapura.

Cultivo celular

- El cultivo de la línea celular C6/36 se realizó en una campana de flujo laminar BSL-2 con filtros HEPA (Marca Lumistell; Celaya, Guanajuato, México). Para dar mantenimiento a la línea celular se empleó medio de cultivo Leibovitz (L-15), solución de aminoácidos no esenciales para medio mínimo esencial de Eagle (100X), solución de antibiótico-antimicótico (100X; Penicilina-Estreptomicina-Anfotericina B) y bicarbonato de sodio al 7.5% esterilizado por membrana, todos de la



marca In vitro, S.A. (México, D.F.). Para suplementar el medio se utilizó suero bovino fetal (SBF) de la marca Hyclone.

- Los procedimientos de cultivo celular para la línea Huh-7 y BHK21 se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar BSL-2 con filtros HEPA (Marca NUAIRE). Para el mantenimiento de la línea celular Huh-7 se utilizó medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium Advanced (Advanced-DMEM), L- Glutamina (200 mM; 100X), suero bovino fetal (SBF), Tripsina-EDTA (0.25%), solución de antibiótico penicilina-estreptomicina (100 UI/mL de penicilina G de sodio y 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina) y solución de aminoácidos no esenciales (10 mM; 100X), todos de la marca GIBCO-BRL (Grand Island, N.Y.).
- Para el mantenimiento de la línea celular BHK-21 se empleó el medio de cultivo MEM suplementado al 7% con suero bovino fetal y sin adición de L-glutamina.
- Para los lavados de las células se empleó una solución buffer de fosfatos (PBS) 1X.
- Para la congelación de líneas celulares se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) de la compañía Sigma.

Recuento celular

- Para realizar el recuento celular se empleó el colorante vital azul tripano 0.4% (marca GIBCO-BRL, Grand Island, N.Y.).

Infección viral de cultivos celulares.

- Para la infección de células C6/36, BHK21 y Huh-7 con DENV se emplearon los mismos reactivos descritos en el apartado de cultivo celular.



Extracción de RNA

- Para la extracción de RNA total a partir de células en monocapa o de aislados de cultivo viral, se empleó el reactivo TRIzol (marca Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), cloroformo (marca Fischer Scientific, New Jersey, USA), Etanol (marca Merck, Darmstadt, Alemania), isopropanol (marca Fischer Scientific, New Jersey, USA) e inhibidor de RNAsas 'RNA out' de la compañía Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).
- Todas las soluciones acuosas se prepararon con agua ultrapura tratada con el inhibidor de RNAsas Dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma Aldrich).

Retrotranscripción (RT)

- Para la síntesis del DNA complementario a partir de RNA total se utilizó la enzima RT-MMLV, Buffer RT 5X, Random primers, Ditiotreitól (DTT), desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) e inhibidor de RNAsas 'RNA out', todos de la compañía Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

- La amplificación del cDNA se realizó utilizando la enzima Taq DNA Polymerase recombinante, buffer 10X para PCR sin Mg^{+2} y cloruro de magnesio 50 mM de la compañía Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).
- Los primers utilizados (D1, D2, TS1, TS2, TS3 y TS4) fueron de la compañía Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Inmunohistoquímica.

- Kit RTU Vectastain (Vector Labs, Burlingame, Ca, USA), utilizando como anticuerpo primario el Anti-Flavivirus Group Antigen Antibody, clon D1-4G2-4-15 (EMD Millipore Corporation, Germany) siguiendo las indicaciones del proveedor.



Ensayos de expresión génica en microarreglos de qPCR

- Se emplearon arreglos de qPCR de la compañía QIAGEN modelo PAHS-016Z para respuesta de Interferón tipo I.

5.3. Materiales

Uso general

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 10 mL. Marca Corning. Cat. 4488.
- Pipetas serológicas de 2 mL. Marca Fisherbrand. Cat. 13-678-11C.
- Tubos falcon de 15 mL. Marca Corning. Cat. 430053.
- Tubos falcon de 50 mL. Marca Corning. Cat. 430291.
- Toallas desechables de papel 'Sanitas'. Marca Kimberly Clark.
- Puntillas desechables blancas (10 μ L). para micropipeta Marca Axygen.
- Puntillas desechables amarillas (200 μ L) para micropipeta. Marca Axygen.
- Puntillas azules (1 mL) para micropipeta. Marca Axygen.

Cultivo celular

- Botellas para cultivo celular de 25 cm².
 - a) Con filtro. Marca Corning. Cat. 430639.
 - b) Con tapa de rosca. Marca Corning. Cat. 430168.
- Botellas para cultivo celular de 75 cm².
 - a) Con filtro. Marca Corning. Cat. 430641.
 - b) Con tapa de rosca. Marca Corning. Cat. 430199.
- Raspadores celulares (gendarmes) de 25 cm. Marca Corning. Cat. 3010.
- Pipeta pasteur. Marca Corning. Cat. 101001440.
- Placas para cultivo celular de 6 pozos. Marca Corning. Cat. 3506.
- Placas para cultivo celular de 24 pozos. Marca Corning. Cat. 3526.



Congelación de células

- Crioviales de 2 mL. Marca Corning. Cat. 430659.

Infección viral de cultivos celulares

- Microtubos de 0.6 mL. Marca Axygen. Cat. MCT-060-C1.
- Microtubos de 1.5 mL. Marca Axygen. Cat. MCT-150-C.
- Placas para cultivo celular de 6 pozos. Marca Corning. Cat. 3506.
- Placas para cultivo celular de 24 pozos. Marca Corning. Cat. 3526.

Extracción de RNA total

- Microtubos de 1.5 mL. Marca Axygen. Cat. MCT-150-C.
- Microtubos de 2 mL. Marca Axygen. Cat. MCT-200.

Técnicas moleculares (RT, PCR, qPCR)

- Microtubos de 0.2 mL. Marca Axygen. Cat. PCR-02-C1.
- Tubos ópticos para qPCR (Tiras de 8 tubos) Applied Biosystems. Part. 4323032.
- Tapas ópticas para tubos de qPCR. Applied Biosystems. Part. 4316567.
- Puntillas desechables blancas (10 μ L) con filtro. Marca Rainin. RT-10F.
- Puntillas desechables amarillas (200 μ L) con filtro. Marca Rainin. RT-200F.
- Agarosa Ultrapure. Marca Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

5.4. Equipo

Uso general

- Centrífuga clínica. Marca Thermo Scientific. Modelo IEC-CLR30R.
- Centrífuga refrigerada. Marca Heraeus. Modelo Biofuge Primo R.
- Microcentrífuga. Marca Eppendorf. Modelo 5415D.



- Microscopio invertido. Marca Olympus. Modelo CKX41
- Ultracongelador Revco. Marca NUAIRE. Modelo UN-6617A36.
- Pipetor Pipet-Aid XP. Marca Drummond. Modelo 4-000-101.
- Baño maría. Marca PRECISION 180.
- Micropipetas.
- Vórtex. Marca Scientific Industries. Modelo Vortex Genie 2 G-560.

Cultivo celular

- Campana de flujo laminar con filtros HEPA. Class II type A2. Marca NU AIRE. Modelo NU-425-400.
- Incubadora con fuente de CO₂. Marca NUAIRE. Modelo UN-4750.
- Incubadora sin fuente de CO₂. Marca Labnet Microincubator. Modelo I5110.
- Bomba de presión y vacío. Marca Daigger. Cat. EF2090G.
- Mechero de bunsen.

Infección viral de cultivos celulares

- Campana de flujo laminar con filtros HEPA. Marca Lumistell. Modelo LV-120.

Técnicas moleculares (extracción de RNA total, RT, PCR, qPCR)

- Campana de PCR. Marca CBS Scientific Co. Modelo P-036-02.
- Termociclador para retrotranscripción. Marca Applied Biosystems. Modelo GeneAmp PCR System 9700.
- Termociclador para PCR punto final: Marca Eppendorf. Modelo Mastercycler gradient.
- Termocicladores de tiempo real: Marca Applied Biosystems. Modelo ABI PRISM 7000 y 7500 fast.
- Micropipetas automáticas de 10 y 200 µL. Marca Rainin.
- Fotodocumentador UVP Mini Darkroom. Marca UVP. (Cambridge, UK) Modelo M-26E.

- Espectrofotómetro NanoDrop. Marca Thermo Scientific. Modelo Nanodrop 2000.
- Cámara de electroforesis. Marca Owl. Modelo B1A.
- Fuente de poder. Marca Bio Rad. Modelo Power Pac 100.
- Horno de micro-ondas. Marca Panasonic.

5.5. Material biológico

5.5.1. Líneas celulares

A) Línea celular C6/36

La línea celular C6/36 es una clona obtenida de la línea original de *Aedes albopictus* establecida por Singh¹⁷⁸ que presenta una alta sensibilidad a la infección por DENV¹⁷⁹. Algunas cepas de dengue son capaces de producir efecto citopático de tipo sincicial en las C6/36. Con mucha frecuencia se observa toxicidad en las células a causa de los inóculos empleados¹⁸⁰.

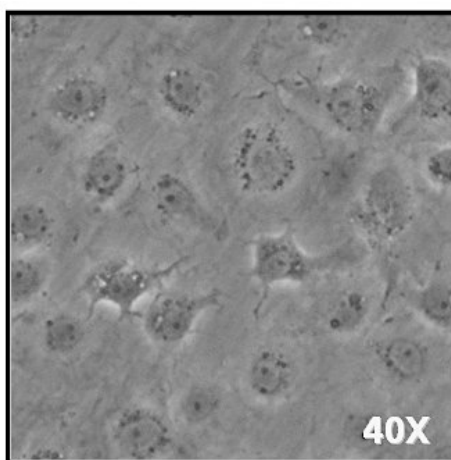


Figura 14. Micrografía de una monocapa de células C6/36.

Se cultivan en medio MEM Earle o Leibovitz L-15 suplementado al 5-10% con suero bovino fetal y se incuban a temperatura ambiente (25-28 °C) sin

requerimiento de atmósfera de CO₂ y en botellas de cultivo cerradas. Su subcultivo se realiza por 'split' proporcional (1:10 semanal generalmente), agitando la botella de cultivo y permitiendo que el medio caiga de forma perpendicular a la monocapa celular (**Figura 14**), aunque también se pueden raspar con ayuda de un gendarme (raspador, *scraper*) de hule.

La línea celular C6/36 fue amablemente donada por la Dra. María Alba Loroño Pino, del Centro de Investigaciones Regionales 'Dr. Hideyo Noguchi' de la Universidad Autónoma de Yucatán.

B) Línea celular Huh-7

Huh-7 (JTC-39) es una línea celular adherente de hepatocitos diferenciados, derivados de un hepatocarcinoma, por ende su nombre. Fue aislada de un paciente masculino japonés de 57 años en septiembre de 1982 y establecida por Nakabayshi, H. y Sato, J en la Universidad de Okayama, Japón.¹⁸¹

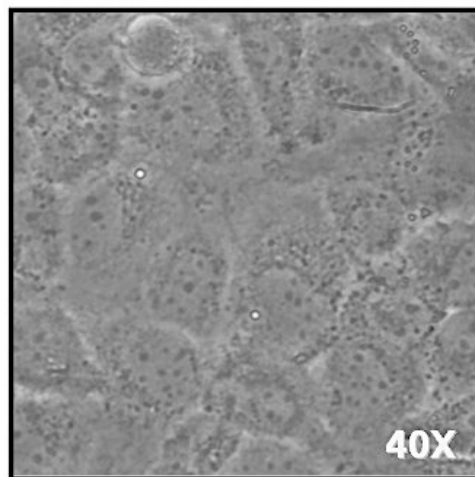


Figura 15. Micrografía de una monocapa de células Huh-7.

Las células se encuentran inmortalizadas y crecen en monocapas bidimensionales (**Figura 15**).¹⁸² Aunque pueden ser cultivadas en ausencia de suero bovino fetal, tradicionalmente se les cultiva con medio

suplementado con 2 al 10% de SBF y se incuban a 37 °C en atmósfera con 5% de CO₂. Para su subcultivo se desprenden con tripsina-EDTA 0.25%.

C) Línea celular BHK-21

La línea celular BHK-21 (clona 13) se derivó a partir de riñones de hámsters bebé (*Baby Hamster Kidney*) de 1 día de edad, en marzo de 1961 por I.A. Macpherson y M.G.P. Stoker.¹⁸³

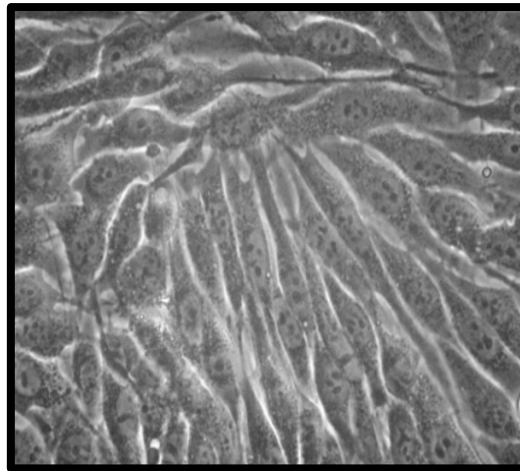


Figura 16. Micrografía de una monocapa de células BHK-21.

Las células BHK-21 son susceptibles a infección por diversos virus, como el adenovirus humano 3, reovirus 2 y el virus de la estomatitis vesicular (cepa Indiana). Son resistentes a la infección con poliovirus 2 y negativas a transcriptasa reversa, lo que implica su ausencia de genomas retrovirales integrados.¹⁸⁴

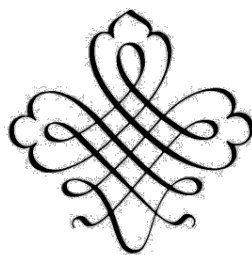
La línea celular BHK-21 fue amablemente donada por la Dra. Rosa María Del Ángel Núñez de Cáceres, del CINVESTAV- Zacatenco.

5.5.2. Virus

Las cepas de dengue utilizadas en esta tesis fueron la H-159911 (DENV-1), H-17247 (DENV-2), H-25924A (DENV-3), H-87 (DENV-3) y H-241 (DENV-4). Todas fueron aisladas a partir de sueros de pacientes virémicos, en cultivos de C6/36, serotipificadas por RT-PCR con el protocolo de Lanciotti y caracterizadas por inmunofluorescencia en el Laboratorio de Arbovirología del Centro de Investigaciones Regionales 'Dr. Hideyo Noguchi' de la Universidad Autónoma de Yucatán. Los virus usados en la presente tesis fueron amablemente donados por la Dra. María Alba Loroño Pino.

VIRUS	CEPA	AÑO	LUGAR	GeneBank ID
DENV 1	H-159911	1944	Hawaii	DQ672563.1
DENV 2	H-17247 (NGC)	1972	Nueva Guinea	M29095.1
DENV 3	H-87	1957	Filipinas	M93130.1
DENV 4	H-241	1956	Filipinas	U18433.1

Tabla 9. Características de los virus prototipo empleados.



CAPÍTULO VI

MÉTODOS



6.1. Estrategia general

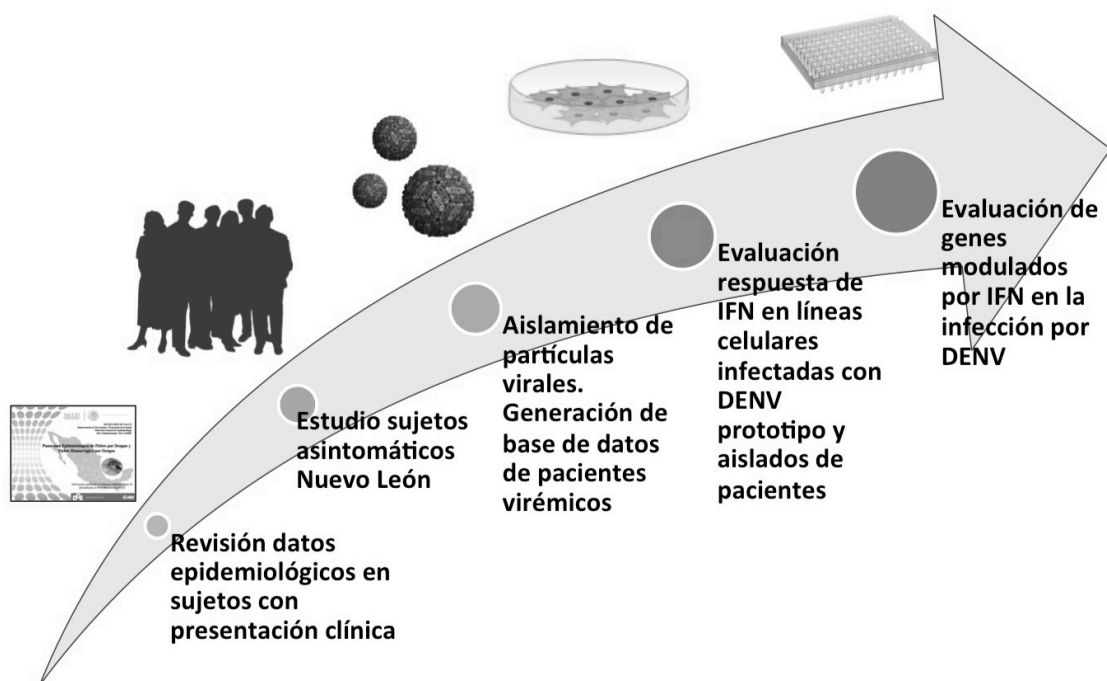


Figura 17. Estrategia general del trabajo desarrollado en la presente tesis

6.2. Métodos

6.2.1. Análisis del panorama epidemiológico nacional de dengue.

Se descendieron del sitio del Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control e Enfermedades de la Secretaría de Salud (CENAVECE) los 52 registros epidemiológicos semanales de casos registrados y confirmados de dengue en México por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica



(SINAVE), del 2008 al 2013. A partir de los datos recolectados ahí, se sumaron los totales nacionales y estatales de casos (en formato pdf), se analizó la proporción FD/DH, defunciones, incidencia, letalidad y los serotipos aislados. A partir de la información capturada en una base de datos, se realizaron gráficas para buscar el periodo anual de mayor incidencia y la periodicidad de los brotes nacional y estatal.

6.2.2. Cultivo de células C6/36.

Las células C6/36 se mantuvieron en medio L-15, haciendo el split cada semana en botellas de 25 cm² para la obtención de monocapas semiconfluentes. Los tubos se cultivaron en una incubadora seca sin fuente de CO₂, a una temperatura entre 26 a 28 °C. Las células se levantaron de sus botellas de cultivo por agitación o por raspado con un gendarme de hule.

6.2.3. Cultivo de células Huh-7.

Las células Huh-7 se mantuvieron en medio de cultivo Advanced DMEM suplementado al 2% con suero bovino fetal, haciendo el split cada tres o cuatro días a la semana, al alcanzar los cultivos un 90% de confluencia. Se incubaron a 37°C bajo atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Las células se levantaron de sus botellas de cultivo empleando Tripsina- EDTA 0.25% a 37°C y después neutralizando la actividad de la enzima con una proporción 1:1 con medio Advanced DMEM con 2% de suero bovino fetal

6.2.4. Cultivo de células BHK-21

Las células BHK-21 se mantuvieron en medio de cultivo MEM suplementado al 7% con suero bovino fetal, haciendo el split dos veces por semana, al alcanzar los cultivos un 90% de confluencia. Se incubaron a 37°C bajo atmósfera húmeda con 5% de CO₂.



Las células se levantaron de sus botellas de cultivo empleando Tripsina-EDTA 0.25% a temperatura ambiente y después neutralizando la actividad de la enzima con una proporción 1:1 con medio MEM suplementado al 7% con suero bovino fetal.

6.2.5. Infección de cultivos celulares con DENV.

Las monocapas semiconfluentes se lavaron con PBS1X, el cual después fue removido por aspiración. El medio de cultivo (botella de 25 cm²) se sustituyó con medio para infección (L-15-2% SBF para la línea C6/36 y ADMEM-1% SBF para la línea Huh-7, ADMEM-2% SBF para BHK-21). El volumen de medio colocado antes de depositar la alícuota viral fue de 2 mL, de tal forma que cubriera la monocapa celular.

Después de colocar suavemente la alícuota del aislado viral infeccioso, se homogenizó realizando movimientos circulares para distribuir las partículas virales en toda la superficie de cultivo.

Las células se incubaron a 37°C durante una hora para permitir la adsorción de las partículas virales. En los casos que fue necesario, después de la adsorción viral se removió el medio de infección, se realizó un segundo lavado con PBS1X para eliminar todas las partículas virales libres y se añadieron 5 mL del medio reducido en suero dependiendo de la línea celular infectada.

Se permitió la infección viral entre 1 a 15 días dependiendo del experimento realizado, permitiendo el mantenimiento del cultivo a 25-27°C para la línea C6/36 y a 37°C con atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en el caso de la línea Huh-7.



6.2.5. Evaluación de presencia de dengue en población asintomática de Nuevo León.

Para evaluar la presencia de infección con DENV en pacientes asintomáticos, se trabajó en conjunto con el Banco de Sangre del Hospital Universitario, UANL, así como con el banco de sangre del Centro Estatal de la Transfusión de la SSA. En el transcurso de enero 2010 a diciembre 2012 en ambos centros registraron en total 285,000 donaciones de sangre.

Del total, recolectamos 2061 muestras, las cuales se probaron para identificar agentes infecciosos definidos por la Norma Oficial Mexicana (NOM-253-SSA-1-2012) en donde se incluyen: Brucella (Rosa de Bengala, LICON labs), HCV (HCV MEIA AxSYM, Abbott Park), VDRL (VDRL-USR, Licon labs), HIV 1-2 (AxSYM HIV Ag/Ab combo MEIA, Abbott Park), HbsAg (HBsAg MEIA 3rd gen AxSYM, Abbott Park), VON(WNV) (IgM capture ELISA, PanBio) y DENV (IgM capture ELISA e IgG indirect ELISA, ambos de PanBio, así como NS1 con Dengue Ag Platelia, Bio-Rad) para verificar seroprevalencia en individuos sanos. Las muestras positivas a DENV NS1 se sometieron a a RT-PCR para verificar presencia de partícula viral.

6.2.6. Recolección de muestras de sujetos infectados a dengue del estado de Nuevo León.

Para aislar partículas virales a partir de sujetos infectados con DENV, se recolectaron muestras en colaboración con el Laboratorio Estatal de Salud Pública de Nuevo León (LESPNL), con el que se tiene firmado un convenio de colaboración. En el transcurso de septiembre, 2010 a junio, 2014 se recolectaron 2145 sueros, probados para IgG, IgM y NS1. Los sueros positivos a proteína viral NS1 se sembraron en células C6/36 para tratar de aislar partículas infecciosas. Se realizó PCR para identificar el RNA viral de



DENV a todos los cultivos celulares infectados, usando el protocolo publicado por Lanciotti.⁶²

6.2.7. Generación del banco de aislados virales.

Los cultivos de C6/36 infectados con DENV se rasparon con ayuda de un gendarme de hule. Una vez removido todo el material adherido a la superficie de la botella de cultivo, se añadieron 300 μ L de mezcla 90:10 suero bovino fetal-bicarbonato de sodio al 7.5% por cada mililitro de medio de cultivo en la botella (para una botella de 25 cm^2 se añadieron 1.5 mL de mezcla de congelación).

El contenido de la botella de cultivo se dividió en 5 tubos de 2 mL rotulados con el serotipo viral, la cepa del virus y la fecha de cosecha. Los virus se mantuvieron en hielo mientras se terminó de procesar todo el volumen de la botella de cultivo. Posteriormente se almacenaron en un ultracongelador a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.2.8. Titulación de aislados virales

Los aislados virales se titularon usando el protocolo de formación de focos o placas líticas en células BHK-21, realizando tinción con el colorante Naphtol Black-Blue. El título viral se reportó como unidades formadoras de placa por mililitro de cultivo viral (UFP/mL).

6.2.9. Extracción de RNA total.

La extracción de RNA tanto de aislados virales como de células en monocapa se realizó con TRIzol, 1 mL de reactivo por cada 10 cm^2 de la botella de cultivo o en una proporción 1:1 con respecto al volumen de aislado



viral empleado para realizar la extracción. El protocolo empleado fue el siguiente:

1. En caso de extraer RNA de una monocapa celular, primero se removió el medio de cultivo para permitir el contacto directo del TRIzol con ellas.
2. Se adicionó el TRIzol a la botella de cultivo o al tubo conteniendo el aislado viral.
3. Se incubó durante 5 minutos para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. En caso de estar haciendo la extracción a partir de células en monocapa fue en este paso que el contenido de la botella se transfirió a un tubo eppendorf de 2 mL.
4. Posteriormente, se adicionaron 200 μ L de cloroformo frío por cada mililitro de TRIzol empleado. Se mezcló por inversión durante 15 segundos. Se incubó en hielo durante 3 minutos.
5. Se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
6. Después de la centrifugación se recuperó en un tubo de 1.5 mL el sobrenadante transparente, puesto que en esta fase es donde se encuentra el RNA. Para su precipitación se añadieron 500 μ L de isopropanol por cada mililitro de TRIzol empleado.
7. Se centrifugó nuevamente a 13000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.
8. Se retiró el sobrenadante y la pastilla de RNA se lavó con 1 mL de etanol al 70% en agua DEPC por cada mililitro de TRIzol empleado.
9. Se mezcló en el vórtex el contenido del tubo.
10. Se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
11. Por último se removió el etanol residual y el RNA se resuspendió en agua DEPC, empleando de 10 a 30 μ L dependiendo del tamaño de la pastilla obtenida.



6.2.10. Retrotranscripción (RT-MMLV).

Una vez realizada la extracción del RNA total, este fue cuantificado y posteriormente sujeto a retrotranscripción utilizando la enzima MMLV. Se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen
Random primer 10X	1 μ L
RNA	5 μ L
Agua DEPC	6.5 μ L
Volumen total	11.5 μL

Tabla 10. Condiciones de reacción para la RT. Primera mezcla.

Una vez preparada esta primera mezcla, se introdujeron los tubos al termociclador para incubarlos a 72 °C durante 10 minutos. Mientras tanto, se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen
Buffer RT 5X	4 μ L
DTT 0.1 M	2 μ L
RNAse out	0.5 μ L
dNTPs 10 mM	1 μ L
RT-MMLV 200U/mL	1 μ L
Volumen total	8.5 μL

Tabla 11. Condiciones de reacción para la RT. Segunda mezcla.

Transcurrido el tiempo de incubación de los tubos en el termociclador, se incubaron durante 3 minutos en hielo y se añadieron los 8.5 μ L de la segunda mezcla de reacción por cada tubo. Posteriormente se continuó con el siguiente programa en el termociclador:



Paso	Temperatura	Tiempo
1	25 °C	10 minutos
2	37 °C	60 minutos
3	94 °C	5 minutos
4	4 °C	10 minutos

Tabla 12. Programa de reacción de retrotranscripción.

Terminado el programa, los tubos se retiraron del termociclador, se rotularon y se almacenaron a -80°C.

6.2.11. Confirmación molecular y serotipificación de dengue.

El protocolo de Lanciotti⁶² para serotipificación del virus del dengue consiste en una retrotranscripción seguida de una amplificación del cDNA para la obtención de amplicones con tamaño distinto para realizar una serotipificación diferencial dependiendo del DENV presente.

Primer	Secuencia	Posición en el genoma	Amplicón (bp)
D1	TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG	134-161	511 (D1-D2)
D2	TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC	616-644	
TS1	CGTCTCAGTGATCCGGGGG	568-586	482 (D1-TS1)
TS2	CGCCACAAGGGCCATGAACAG	232-252	119 (D1-TS2)
TS3	TAACATCATCATGAGACAGAGC	400-421	290 (D1-TS3)
TS4	CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA	506-527	392 (D1-TS4)

Tabla 13. Secuencias de los primers empleados para la PCR de Lanciotti.

La reacción se optimizó para poder trabajar con el cDNA viral y después en un segundo paso amplificarlo. Para la reacción de PCR se preparó la correspondiente mezcla de reacción indicada en la **tabla 14** y se corrió con el programa de temperaturas descrito en la **tabla 15**.



PCR D1-D2		PCR D1-TS	
Reactivo y concentración	Volumen (μL)	Reactivo y concentración	Volumen (μL)
Agua Mili Q	13.8 μL	Agua Mili Q	12.2 μL
Buffer PCR 10X	2 μL	Buffer PCR 10X	2.5 μL
MgCl ₂ 50 mM	1.5 μL	MgCl ₂ 50 mM	1.5 μL
dNTPs 10 mM	0.5 μL	dNTPs 10 mM	0.5 μL
Primer D1 10 μM	0.7 μL	Primer D1 10 μM	1 μL
Primer TS1 10 μM	0.7 μL	Primer TS1 10 μM	0.5 μL
Taq polimerasa	0.3 μL	Primer TS2 10 μM	0.5 μL
cDNA	5 μL	Primer TS3 10 μM	0.5 μL
Volumen total	25 μL	Primer TS4 10 μM	0.5 μL
		Taq polimerasa	0.3 μL
		cDNA	5 μL
		Volumen total	20 μL

Tabla 14. Condiciones de reacción para la detección molecular de DENV.

Los productos amplificados se verificaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Los geles se corrieron a 100 V durante una hora.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	5 minutos
2	94 °C	1 minuto
3	60 °C	40 segundos
4	72 °C	40 segundos
5	Ir al paso 2, 40 veces	
6	72 °C	10 minutos
7	4°C	Esperar

Tabla 15. Programa de temperaturas para la detección molecular de dengue.



6.2.12. Inmunohistoquímica

Para confirmar infección en los cultivos celulares, se realizó inmunohistoquímica con el kit RTU Vectastain (Vector Labs, Burlingame, Ca, USA siguiendo las indicaciones del proveedor., utilizando como anticuerpo primario el Anti-Flavivirus Group Antigen Antibody, clone D1-4G2-4-15 (EMD Millipore Corporation, Germany), a una dilución 1:3000.

6.2.13. Western Blot

Se evaluó la abundancia de la proteína STAT-1 en cultivos infectados con el virus del dengue, tanto prototipos como con aislados de pacientes. Se removió el medio de cultivo de las células infectadas por aspiración y posteriormente, las células fueron raspadas con un gendarme de goma. Se utilizó PBS frío 1X para lavar las células, las cuales posteriormente se centrifugaron 15 segundos a máxima velocidad para empaquetarlas, se removió el PBS y se extrajo la proteína total con buffer de lisis 1X en una relación volumen-volumen 1:1. El lisado se incubó 20 minutos en hielo y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se separó y se almacenó a -80°C. Se cuantificó la concentración de las proteínas totales por Bradford, usando una curva estándar. Se cargaron 50 µg de proteína total por pozo en un gel de polacrilamida (12%, PAGE-SDS), el cual se corrió a 100 V durante dos horas. Se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF (Amersham Hybond-P, GE Healthcare, RPN303F) a 400 mA durante 90 minutos, la membrana se bloqueó con TBS-Tween 0.1% por 60 minutos, y se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron 5 lavados de 10 minutos cada uno con TBS-Tween 0.1% frío, y se incubó con el anticuerpo secundario durante 90 minutos. La membrana se volvió a lavar con TBS-tween 0.1% tres veces, 10 minutos por lavado. Finalmente, la detección de la proteína se realizó por quimioluminiscencia (ImmunoCruz wester blotting luminol reagent, Santa Cruz, USA). Para la



captura de imagen se usó el fotodocumentador Chemidoc XRS (Bio-Rad, Alemania). El análisis densitométrico se realizó con el software Image J (NIH). Se utilizaron los anticuerpos anti STAT-1 (1:1000, Abcam, ab99415, USA), anti- Actina (1:5000, Millipore, mab1501, USA) y los anticuerpos secundarios Anti-ratón (1:10000, Promega, W4021, USA) y anti-conejo (1:10000, Santa Cruz, sc-217, USA).

6.2.14. Infección de ratones lactantes.

En el transcurso de dos estancias de investigación (marzo-abril y agosto-octubre, 2012) realizadas en el Laboratorio de Virología del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del IPM CiNVESTAV Zacatenco, se inocularon intracerebralmente con aislado de cultivo celular C6/36-DENV a 18 camadas de ratones lactantes BALB/C obtenidos a partir de 22 hembras gestantes. Se inocularon los virus prototipo DENV-1 y 2, así como el aislado DENV1-4904 (1 unidad de jeringa de insulina a cada ratón lactante, jeringas BD Ultrafine 0.5mL con aguja 31Gx8mm). Se permitió la evolución de la infección durante cinco días y transcurrido el tiempo los ratones se sacrificaron por frío y se extrajo el cerebro con ayuda de una jeringa. Los ratones infectados se evaluaron por clínica, observando elevación de la temperatura corporal al tacto, presencia de convulsiones, dificultad de movimiento en las extremidades traseras y dificultad para erguirse.

El extracto de cerebro se mezcló en una proporción 1:1 con solución salina de Hanks, se maceró en un homogenizador Dounce y se filtró a través de una membrana de 0.22 μ m (Millipore) para posteriormente ser alicuotados en volúmenes de 100 μ L y ser congelados a -80°C. Los extractos de cerebro de ratón se titularon con células BHK-21 y se les hizo ELISA con el kit Platelia Dengue NS1 Ag (Bio-Rad) para confirmar positividad de partículas virales.



6.2.14. Arreglos de qPCR.

Para evaluar la respuesta de interferón en cultivos de células Huh-7 infectadas con aislados virales de DENV a una MOI de 0.1, se emplearon los **RT² Profiler PCR Array: Human Type I Interferon Response** (PAHS-016ZA. Cat.330231, QIAGEN).

El RNA de los cultivos celulares se extrajo con el kit RNeasy Plus Mini Kit (Cat.74134, QIAGEN), la retrotranscripción se montó con el kit RT² First Strand Kit (Cat. 330401, QIAGEN). La mezcla de reacción con los cDNA a montar en las placas se realizó con el kit RT² SYBR[®] Green ROX qPCR Mastermix (cat. 330520, QIAGEN). Todo bajo las condiciones indicadas por el proveedor descritas en el **RT² Profiler PCR Array Handbook** (QIAGEN). La integridad de los RNAs extraídos se evaluó por medio de electroforesis capilar (Experion, Bio-Rad) y las concentraciones del RNA total, así como de las diluciones de trabajo se midieron por espectrofotometría (NanoDrop 2000, Thermo Scientific.).

El arreglo Human Type I Interferon Response RT² Profiler PCR Array es una herramienta intermedia entre la tecnología de PCR en tiempo real (qPCR) y los microarreglos. Esta plataforma tecnológica permite la evaluación de los perfiles de expresión de genes involucrados en la respuesta inmune global de interferones α y β . El arreglo contiene sondas para cuantificar la expresión de IFN alfa, beta y sus receptores (IFNAR), así como moléculas de señalización involucradas en el proceso y genes estimulados por IFN que son los responsables del establecimiento del estado antiviral celular. También se incluyen genes que se han asociado con resistencia a IFN intrínseca y asociada con virus. La disposición del arreglo PAHS-016A se muestra en la **figura 18**.

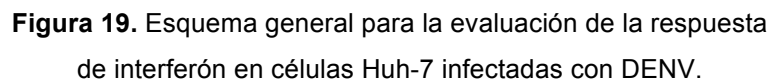


	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ADAR	BAG3	BST2	CASP1	CAV1	CCL2	CCL5	CD70	CD80	CD86	CDKN1B	CIITA
B	CRP	CXCL10	DDX58	EIF2AK2	GBP1	HLA-A	HLA-B	HLA-E	HLA-G	IFI16	IFI27	IFI30
C	IFI16	IFIH1	IFIT1	IFIT2	IFIT3	IFITM1	IFITM2	IFITM3	IFNA1	IFNA2	IFNA4	IFNAR1
D	IFNAR2	IFNB1	IFNE	IFNW1	IL10	IL15	IL6	IRF1	IRF2	IRF3	IRF5	IRF7
E	IRF9	ISG15	ISG20	JAK1	JAK2	MAL	MET	MNDA	MX1	MX2	MYD88	NMI
F	NOS2	OAS1	OAS2	PML	PRKCZ	PSME2	SH2D1A	SHB	SOCS1	STAT1	STAT2	STAT3
G	TAP1	TICAM1	TIMP1	TLR3	TLR7	TLR8	TLR9	TMEM173	TNFSF10	TRAF3	TYK2	VEGFA
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Figura 18. Disposición de los genes de estudio dentro del arreglo PAHS-016A para respuesta a IFN tipo I. En los 96 pozos, los genes se encuentran organizados de la siguiente manera: **A1-G12**: 84 genes de estudio involucrados con la respuesta de IFN tipo I; **H1-H5**: 5 genes constitutivos (*housekeeping*) para normalización; **H6**: 1 control de contaminación por DNA genómico; **H7-H9**: 3 controles positivos de retrotranscripción; **H10-H12**: 3 controles positivos para PCR.

Los datos obtenidos por el termociclador ABI 7000 y ABI 7500 fast (Applied Biosystems) se exportaron a Microsoft Excel para posteriormente ser analizados por la plataforma RT² Profiler PCR Array Data Analysis versión 3.5. (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) A partir de la plataforma online se exportaron las gráficas de expresión para cada gen y cada grupo experimental, los mapas de calor y en una tabla se calculó el *Fold Change* (nivel de cambio) de cada gen.

Los *fold change* de cada condición experimental se analizaron, se convirtieron en cadenas de texto proporcionales al valor de cada cantidad y se exportaron a la plataforma online **Wordle** (<http://www.wordle.net/>) para la generación de esquemas tipo 'nube de palabras' donde el tamaño de cada nombre del gen se relaciona con la intensidad de su nivel de sobreexpresión. (Figura 19)



Interferones y receptores: IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNAR1, IFNAR2, IFNB1, IFNE, IFNW1.

Inmunidad innata: ADAR, BST2, CASP1 (ICE), CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), DDX58, GBP1, HLA-E, HLA-G, IFI27, IFI30, IFI6 (G1P3), IFIH1,



IFIT1, IFIT2, IFIT3, IFITM1 (9-27), IFITM2, IFITM3, IRF1, IRF2, IRF7, IRF9 (ISGF3G), ISG15 (G1P2), ISG20, JAK2, MX1, MX2, MYD88, NMI, OAS1, OAS2, PML, SOCS1, STAT1, STAT2, TAP1 (ABCB2), TLR3, TLR7.

Inmunidad adaptativa: CD80, CRP, MYD88, TAP1 (ABCB2).

Citocinas: CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), CXCL10 (INP10), IL15, TNFSF10 (TRAIL).

Apoptosis: ADAR, CASP1 (ICE), CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES), EIF2AK2 (PRKR), IFI16, IFI27, IFI6 (G1P3), IFIH1, JAK2, MX1, MYD88, PML, STAT1, TIMP1, TLR3, TNFSF10 (TRAIL).

Otros genes involucrados en la respuesta a Interferón tipo I:

Inmunidad innata: CD86, CIITA, HLA-A, HLA-B, IFNA2, IFNA4, IFNAR1, IFNAR2, IFNB1, IRF3, IRF5, JAK1, NOS2 (iNOS), SH2D1A, STAT3, TICAM1 (TRIF), TLR8, TLR9, TMEM173, TRAF3, TYK2.

Inmunidad adaptativa: IFNA2, IFNB1, IL10, TLR8, VEGFA.

Citocinas: CD70 (TNFSF7), IL10, IL6, VEGFA.

Apoptosis: BAG3, CAV1, CD70 (TNFSF7), CDKN1B (p27KIP1), IFNA2, IFNB1, IL10, IL6, MAL, MET, MND4, PRKCZ, PSME2, SHB, TICAM1 (TRIF), TMEM173, TRAF3, VEGFA.

La lista detallada de genes contenidos en el arreglo, símbolos y números de identificación en Genbank se incluye en un anexo en la sección correspondiente.

CAPÍTULO VII

RESULTADOS



7.1. Descripción del panorama epidemiológico del dengue en Nuevo León de 2008 a 2013.

A partir de los registros epidemiológicos semanales publicados por CENAVECE/SINAVE, se desglosaron el total de casos nacionales y estatales confirmados de dengue en el periodo comprendido de 2008 a 2013, para observar la tendencia anual en el aumento o disminución de ellos.

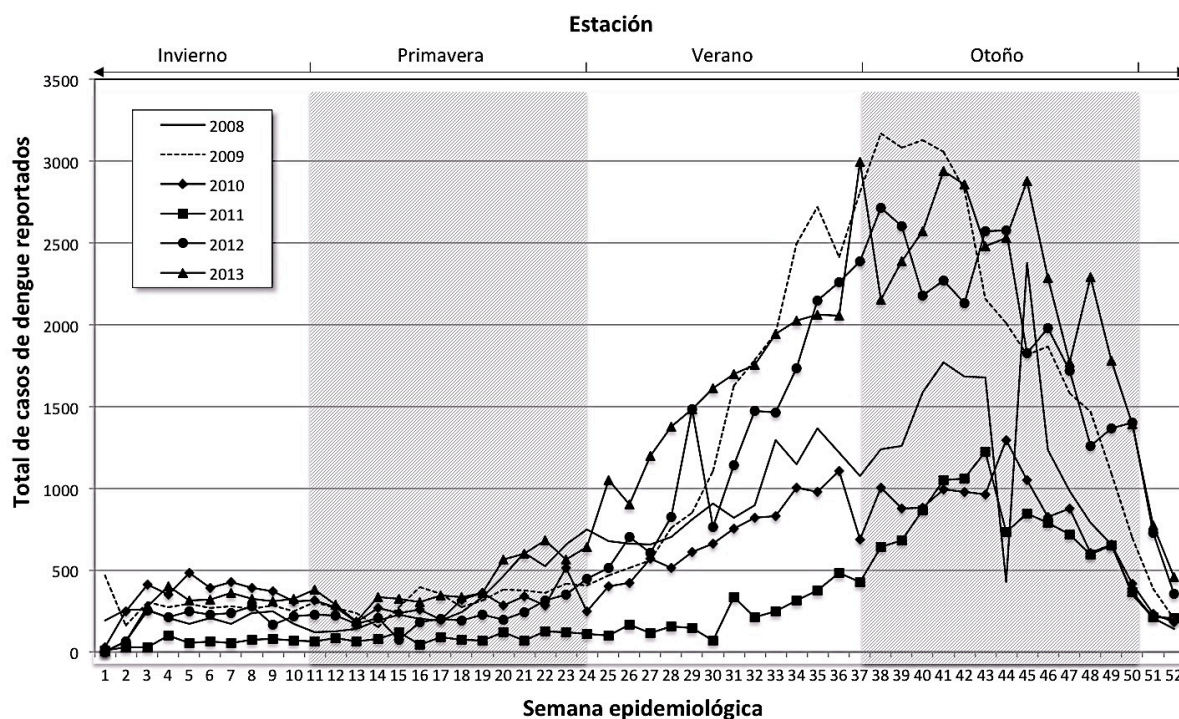


Figura 20. Número de casos nacionales de dengue desglosados por semana epidemiológica en el periodo 2008 – 2013.

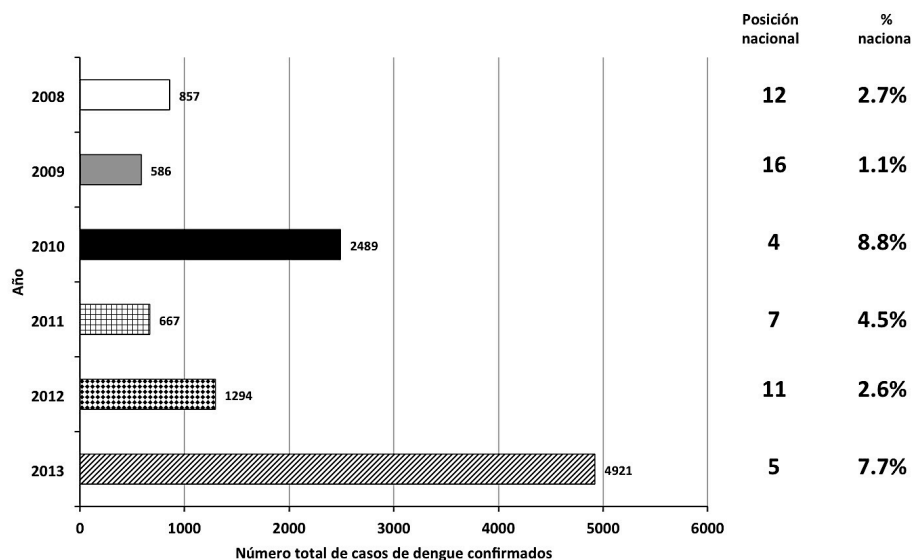


Figura 21. Contribución del estado de Nuevo León al total de casos nacionales en el periodo 2008 – 2013.

Después de confirmar que Nuevo León efectivamente puede ser catalogado como una entidad endémica a la circulación de DENV, se decidió repetir el análisis desglosando los totales estatales 2008-2013.

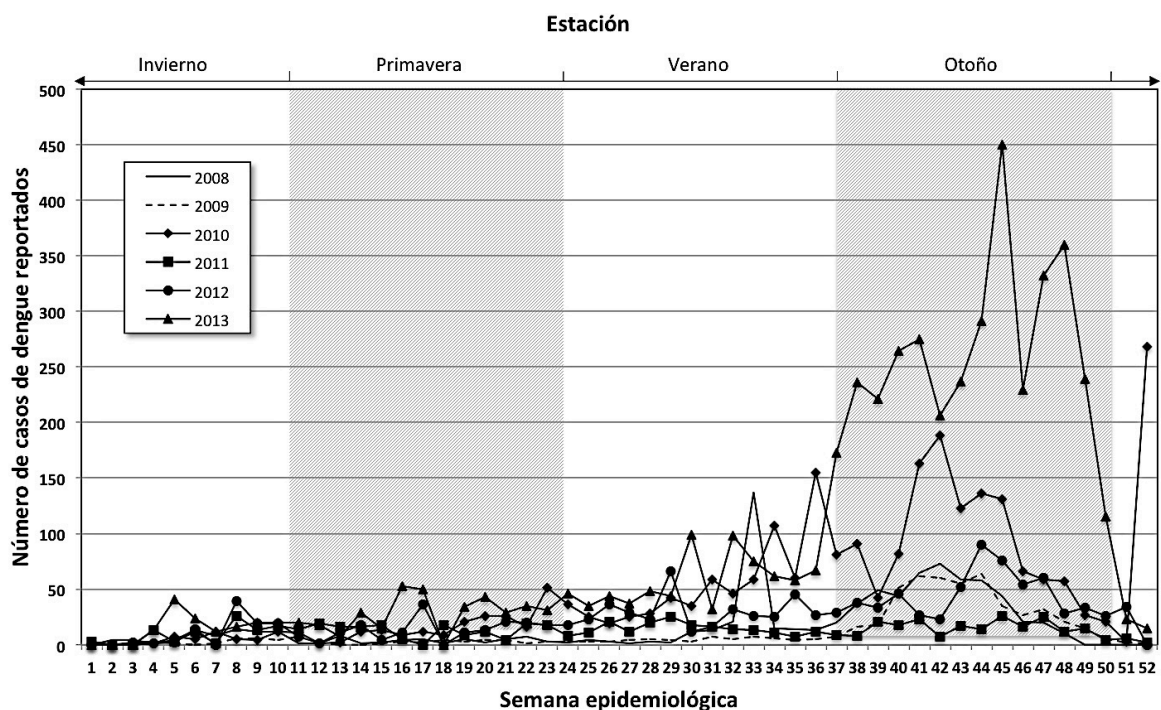


Figura 22. Número de casos de dengue en Nuevo León desglosados por semana epidemiológica durante el periodo 2008 – 2013.

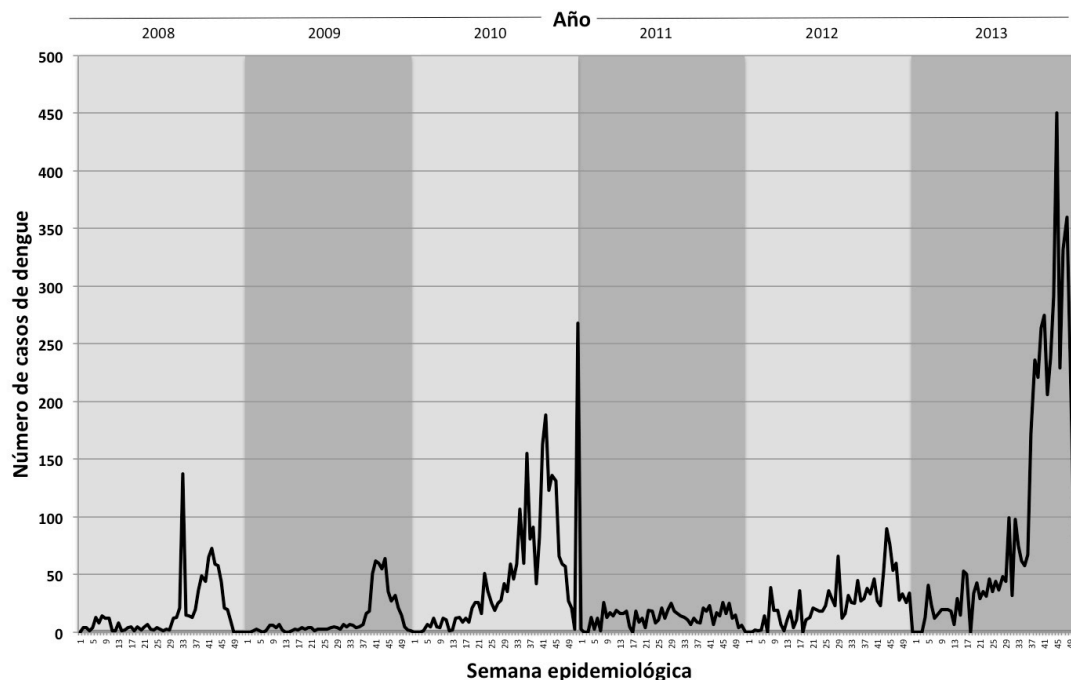


Figura 23. Número de casos de dengue en Nuevo León en el periodo 2008 – 2013 desglosados por semana epidemiológica y representados en orden de año de registro.

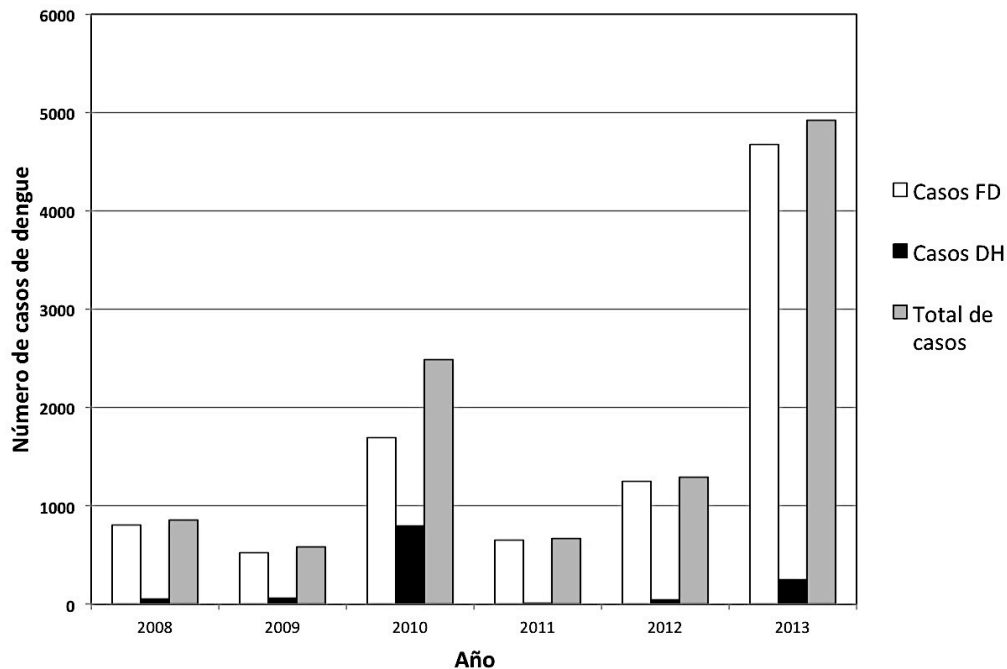


Figura 24. Total de casos confirmados de dengue en Nuevo León en el periodo 2008 – 2013.



Año	Casos FD	Casos FHD	Casos totales	Defunciones	incidencia	Letalidad	Serotipos			
							1	2	3	4
2008	803	54	857	0	26.6	0	52	2	0	0
2009	524	62	586	0	22	1.61	21	2	0	0
2010	1696	793	2489	1	19	1.1	76	2	0	0
2011	654	13	667	0	15.3	0	2	6	0	0
2012	1250	44	1294	0	34.85	0.91	67	80	0	0
2013	4675	246	4921	0	99.7	0.56	394	326	0	115
		Total	10814				612	418	0	115

Tabla 16. Casos y serotipos de dengue confirmados en Nuevo León en el periodo 2008 – 2013.

7.2. Evaluación de la presencia de infección con DENV en individuos asintomáticos de Nuevo León.

Se evaluó presencia de diferentes agentes infecciosos en 2061 muestras de sangre de donadores asintomáticos sanos del estado de Nuevo León, con edades en el rango de 18 a 65 años y sexo indistinto. Se obtuvieron 10 mL de sangre completa para realizar las pruebas serológicas y moleculares.

En general se encontró una seroprevalencia del 2.6% (1/39) de anticuerpos anti-dengue en donadores de sangre estudiados en el periodo 2010-2012 en el estado de Nuevo León (**Figura 25**). Debido a que las pruebas de laboratorio permitieron distinguir infecciones primarias de las secundarias, se encontró que 53 de 2061 sueros obtenidos a partir de donantes asintomáticos fueron reactivos a anti-DENV de la siguiente manera: Los anticuerpos IgM eran sugestivos de una infección recientemente adquirida y fueron detectados en 23 muestras, mientras que en 30 donadores se detectó IgG anti-DENV, sugiriendo una infección secundaria reciente.

Todos los individuos estaban asintomáticos al momento de la donación, la mayoría de los casos positivos fueron hombres (83%), con una edad

promedio de 31.8 años y ninguno de los donadores estaba virémico (no positividad a RT-PCR).

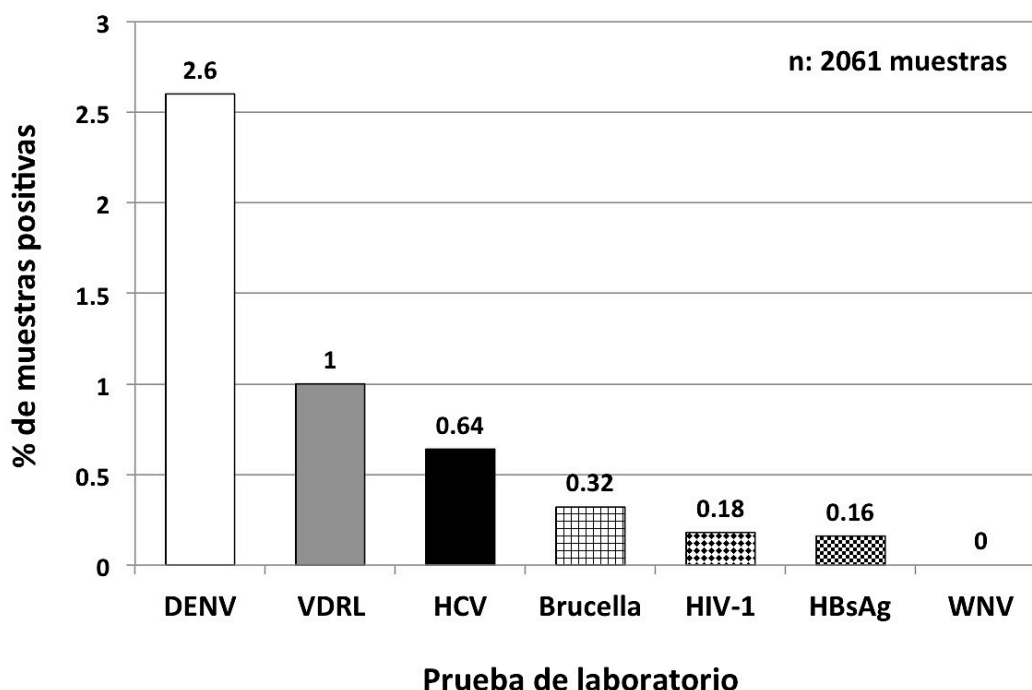


Figura 25. Resultados de las pruebas realizadas para los 2061 sueros de donantes asintomáticos.

7.3. Generación de un banco de muestras de individuos positivos a infección con DENV del estado de Nuevo León.

En el transcurso del periodo comprendido entre septiembre 2010 a junio 2014, se recolectaron 2145 sueros de individuos diagnosticados como positivos a dengue siguiendo el algoritmo del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Nuevo León, definido por la NOM-032-SSA2-2002.¹⁸⁵ La **tabla 17** describe las características de las muestras recolectadas: totales anuales, género, grupos de edades, clasificación del cuadro clínico y el diagnóstico realizado por LESP-NL.



Muestras recolectadas por año	n	%
2010	92	4.3
2011	375	17.5
2012	839	39.1
2013	616	28.7
2014	223	10.4
Total	2145	100
Género		
M	710	33.1
F	1435	66.9
Total	2145	100
Grupos de edades		
Menores de 18	483	22.5
18 - 40	781	36.4
41 - 60	603	28.1
Mayores de 60	279	13
Total	2146	100
Clasificación del cuadro clínico		
FD	2106	98.2
DH	39	1.8
Total	2145	100
Diagnóstico de laboratorio		
IgG	648	30.2
IgM	1111	51.8
NS1	386	18
Total	2145	100

Tabla 17. Epidemiología de los sueros positivos a dengue recolectados.

A partir de los datos recolectados se generó una base de datos donde se incluyó género, edad, municipio, colonia o fraccionamiento, diagnóstico de laboratorio, fecha de inicio de los síntomas y fecha de toma de muestra para cada sujeto. A partir de los datos de ubicación, se decidió georreferenciar los casos de dengue a nivel estatal, utilizando el software ArcGis (ArcMap 10.1) para ubicar las zonas con mayor incidencia a nivel estatal de donde se presentaron los casos positivos de dengue. (**Figura 26**)

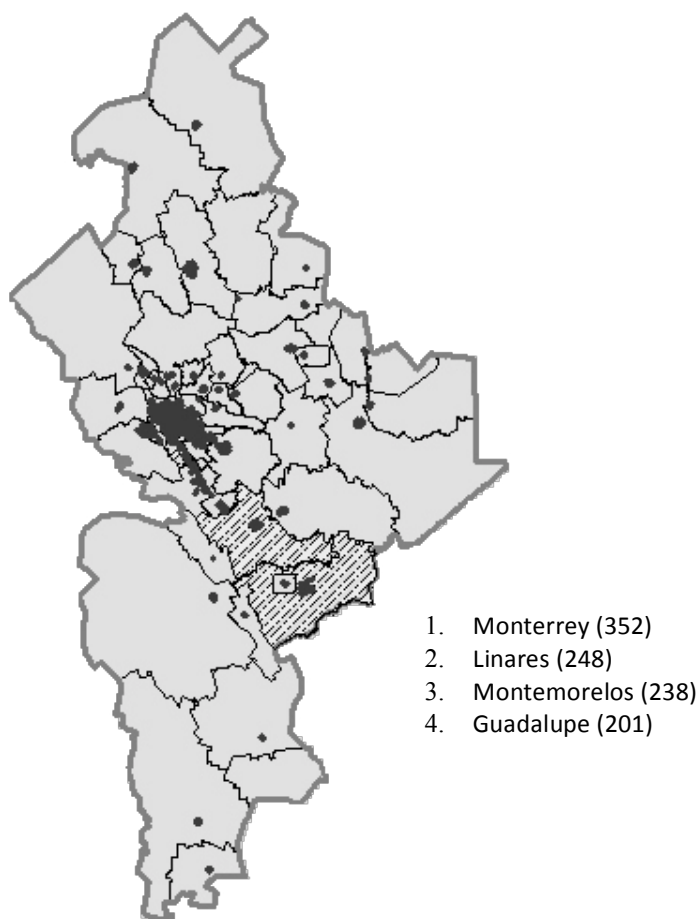


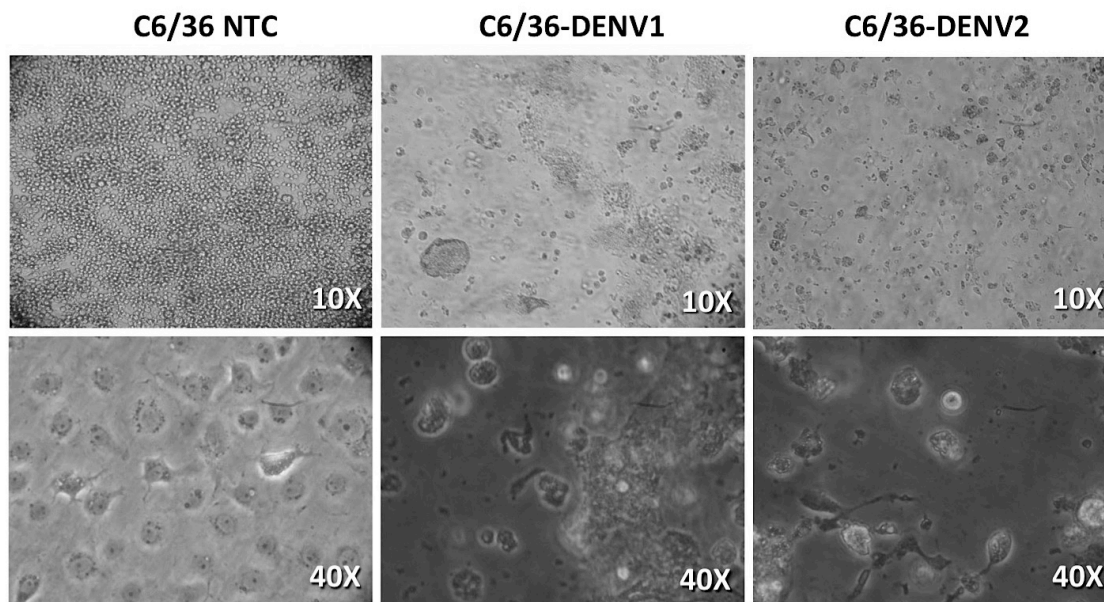
Figura 26. Georreferenciación de los casos de dengue identificados por LESP, recolectados de septiembre 2010 a junio 2014. Cada punto es un caso positivo a infección con DENV.

El total de los sueros recolectados (1 mL de cada uno) se almacenó en un ultracongelador a -80°C clasificado por el año de recolección y el diagnóstico de laboratorio.

7.4. Aislamiento y caracterización de partículas virales a partir de sueros de individuos infectados con DENV.

Los 386 sueros NS1 positivos se sembraron en la línea celular C6/36 para tratar de aislar partículas virales. De forma simultánea se sembraron virus prototipo para usar como control tanto de positividad en cultivo (evaluación

CPE por microscopía), así como para el diagnóstico molecular por RT-PCR. (Figura 27).



*15 días de cultivo/ 27°C/ sin fuente externa de CO₂

Figura 27. Cultivo de DENV en células C6/36.

Se permitió la infección en los 386 cultivos celulares infectados con suero de individuos diagnosticados como positivos a dengue, máximo por 15 días. Tras lo cual se cosechó con raspador y se alicuotaron en volúmenes de 100 a 200 μ L. Posterior a la congelación, ninguna alícuota se descongeló más que para su evaluación molecular o para emplearlas en procesos de infección de células. No se almacenaron aislados previamente usados.

De las alícuotas realizadas, se extrajo RNA total de cada lote de cultivos infectados, se retrotranscribió y se evaluó presencia de partículas virales empleando el protocolo de amplificación de Lanciotti. (Figura 28)

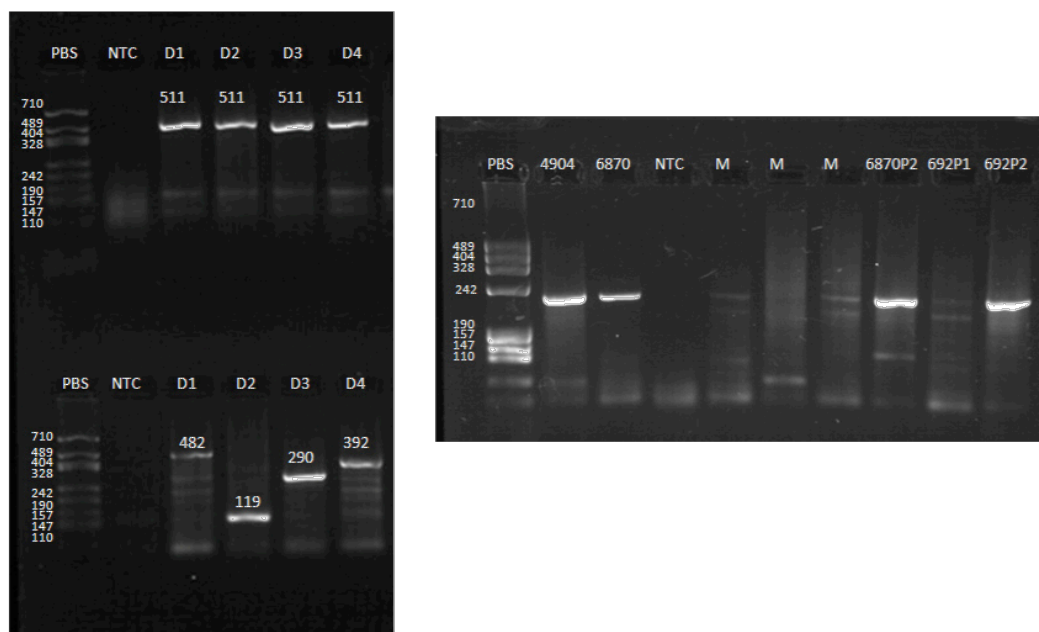


Figura 28. Evaluación molecular del virus del dengue por medio del protocolo de Lanciotti. El gel a la izquierda muestra el patrón de bandas de los cuatro serotipos, mientras que el de la derecha es la evaluación de cultivos de sueros de individuos infectados.

De los 386 cultivos infectados, 13 fueron positivos a presencia de partícula viral: Seis serotipificaron como DENV-1, seis como DENV-2 y uno como DENV-4. En colaboración con con el LESP-NL se evaluaron los cultivos por PCR en tiempo real (empleando el protocolo de SSA-InDRe) para descartar la presencia de coinfecciones, encontrando que los 13 cultivos estaban infectados por serotipos individuales. (**Tabla 18**)

Aislado	Año	Serotipo	Aislado	Año	Serotipo
4904	2011	1	6295	2013	2
6870	2012	2	6313	2013	4
692	2013	1	7803	2013	2
694	2013	2	7693	2013	1
696	2013	1	7088	2013	1
5849	2013	2	7708	2013	1
6262	2013	2			

Tabla 18. Lista de aislados virales, año de recolección y serotipo confirmado.

Los cultivos también se evaluaron por inmunohistoquímica, para confirmar con una segunda herramienta la presencia de partículas virales. Se empleó el kit RTU Vectastain en conjunto con el anticuerpo primario dirigido contra envoltura de Flavivirus (4G2). Se encontró que algunos de los virus aislados de pacientes, como el 694 y 696 generaban una respuesta positiva a la IHQ más intensa que los virus prototipo (**Figura 29**).

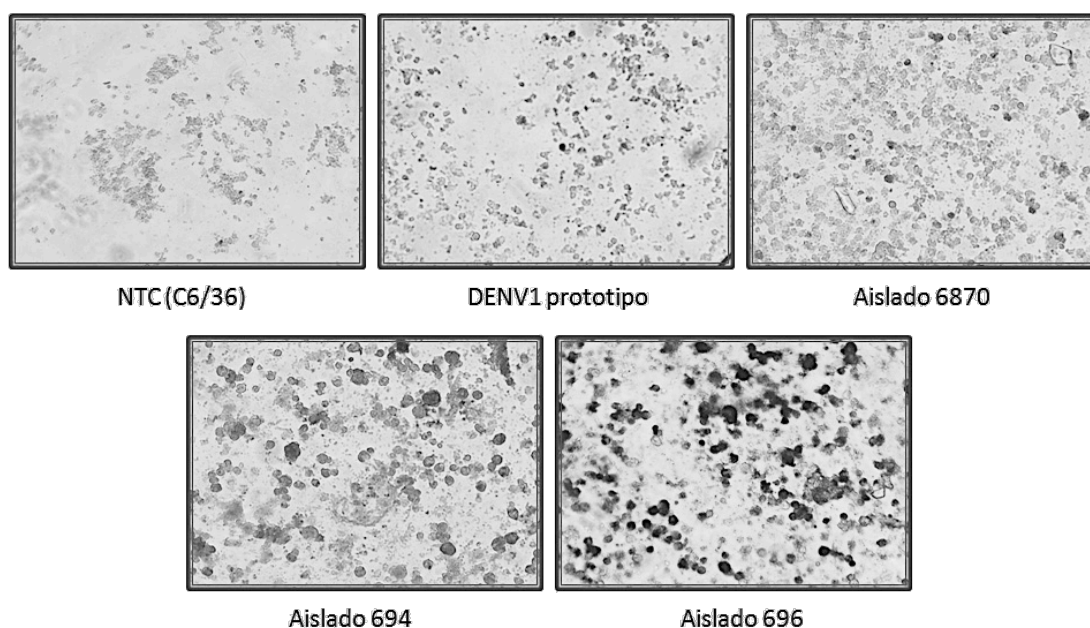


Figura 29. Inmunohistoquímica de células C6/36 infectadas con DENV realizando el marcaje con anticuerpo 4G2.

Para confirmar la presencia de virus diferentes en los cultivos, en colaboración con CDC Dengue Branch y como parte de la tesis de maestría del M.C. Kame Alberto Galán Huerta¹⁸⁶ se secuenciaron los aislados virales amplificados, encontrando que pertenecían a genotipos América-África (DENV-1) y América-Asia (DENV2). (**Figuras 30 y 31**)

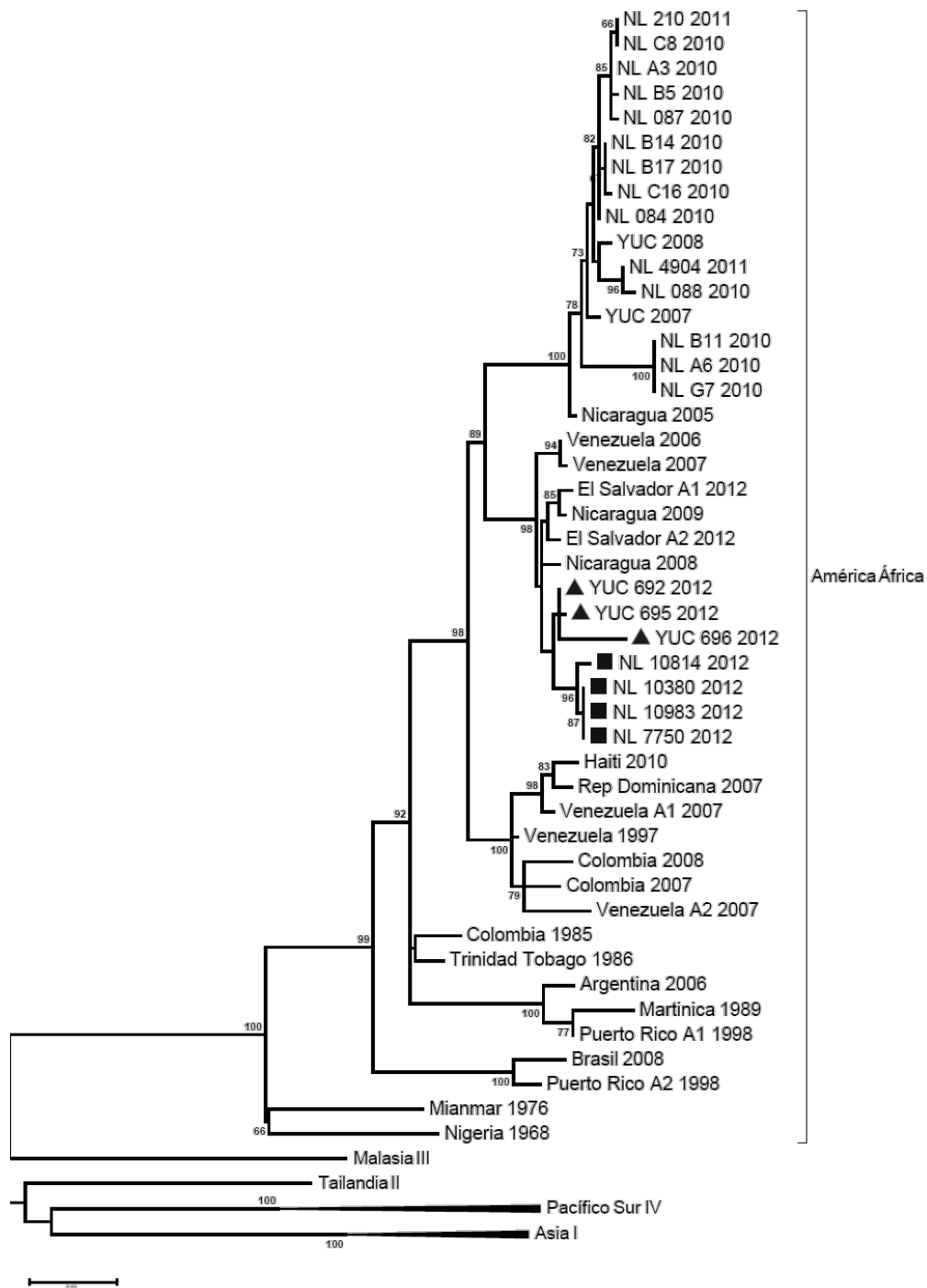


Figura 30. Filogenia de los aislados virales obtenidos caracterizados como DENV-1.

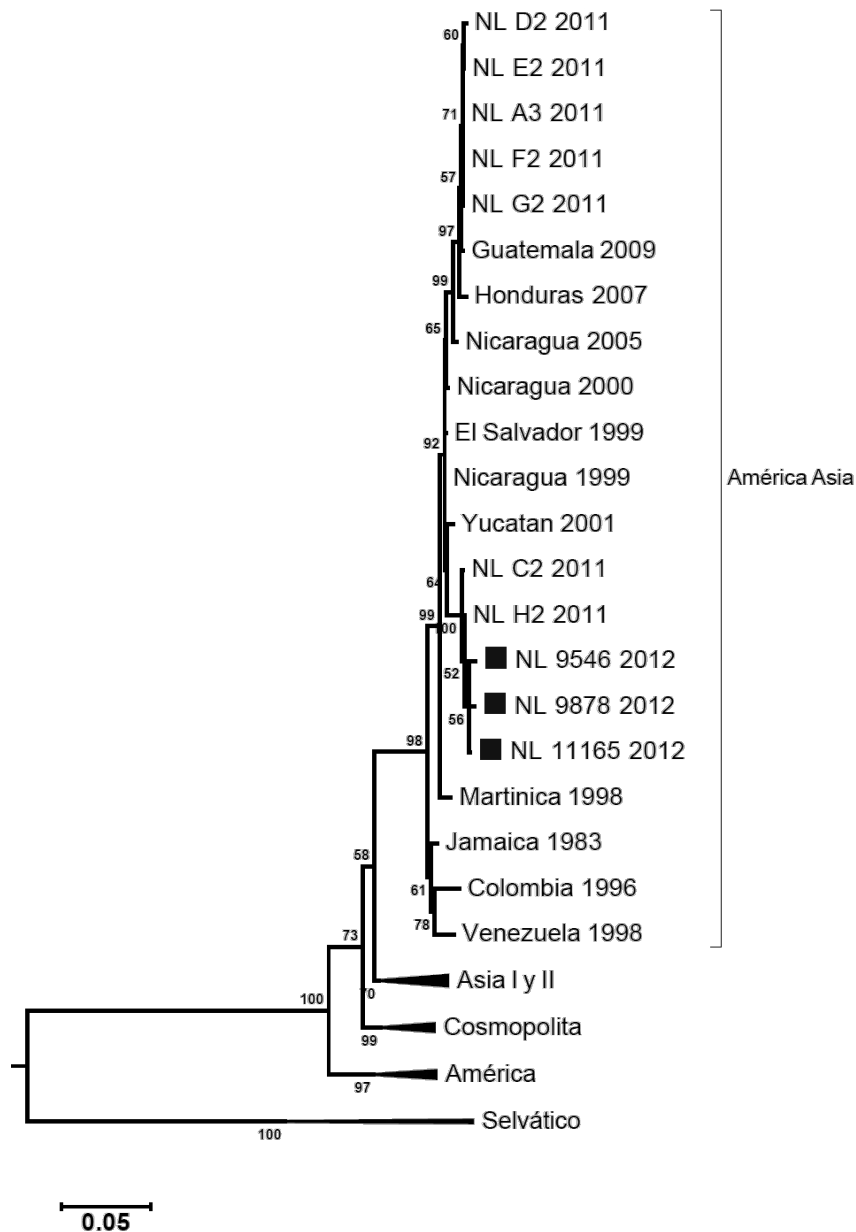


Figura 31. Filogenia de los aislados virales obtenidos caracterizados como DENV-2.

Todos los lotes de aislados virales y virus prototipo se titularon en células BHK-21, procurando usar virus de bajos pasajes (no más de dos cultivos sucesivos), para reducir las posibilidades de mutaciones inherentes a los

errores de replicación viral. Se obtuvieron títulos virales en el rango de 10^5 - 10^6 UFP/mL. (**Tabla 19**)

LOTE VIRAL	TÍTULO VIRAL (PFU/mL)	LOTE VIRAL	TÍTULO VIRAL (PFU/mL)
D1 – 20121217	2.25×10^6	D1 4904 P2 - 20130207	5×10^6
D1 – 20130201	1.25×10^6	D1 4904 P3 - 20130222	5×10^6
D2 – 20121217	1×10^6	D2 6870 P1 - 20130213	1×10^5
D2 – 20130201	1.25×10^5	D2 6870 P2 - 20130228	1×10^5
D3 – 20130201	2.5×10^6	D2 692 P1 – 20130207	2.75×10^6
D3 – 20121217	1.25×10^6	D2 692 P2- 20130228	2.75×10^6

Tabla 19. Títulos virales de algunos aislados cultivados en células C6/36

7.5. Evaluación de la infectividad de las partículas virales aisladas en un sistema *In vivo*.

Durante el periodo marzo- abril y agosto-octubre del 2012 se realizaron dos estancias de investigación en el Laboratorio de Virología del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV Unidad Zacatenco, en México, D.F. El objetivo de las estancias de investigación fue el de amplificar los títulos virales de los virus DENV aislados en cultivo celular bajo el protocolo en un sistema *In vivo* que ellos tienen estandarizado.^{187,188}

Para lograr este objetivo, se trabajaron con ratones lactantes BALB/c a los cuales se les inoculó intracerebralmente virus amplificado en células C6/36 (1 unidad de jeringa de insulina por ratón, 100 μ L) de prototipo D1, prototipo D2, aislado D1 4904 y aislado D2 6870.¹⁸⁷

Se trabajó en total con 22 camadas de ratones lactantes, con un rango de 6 a 10 individuos por camada. Se realizaron dos pasajes de los virus. El primer pasaje se realizó inoculando cultivo celular y en el segundo se inoculó extracto de cerebro proveniente de la primera amplificación. (**Figura 32**)

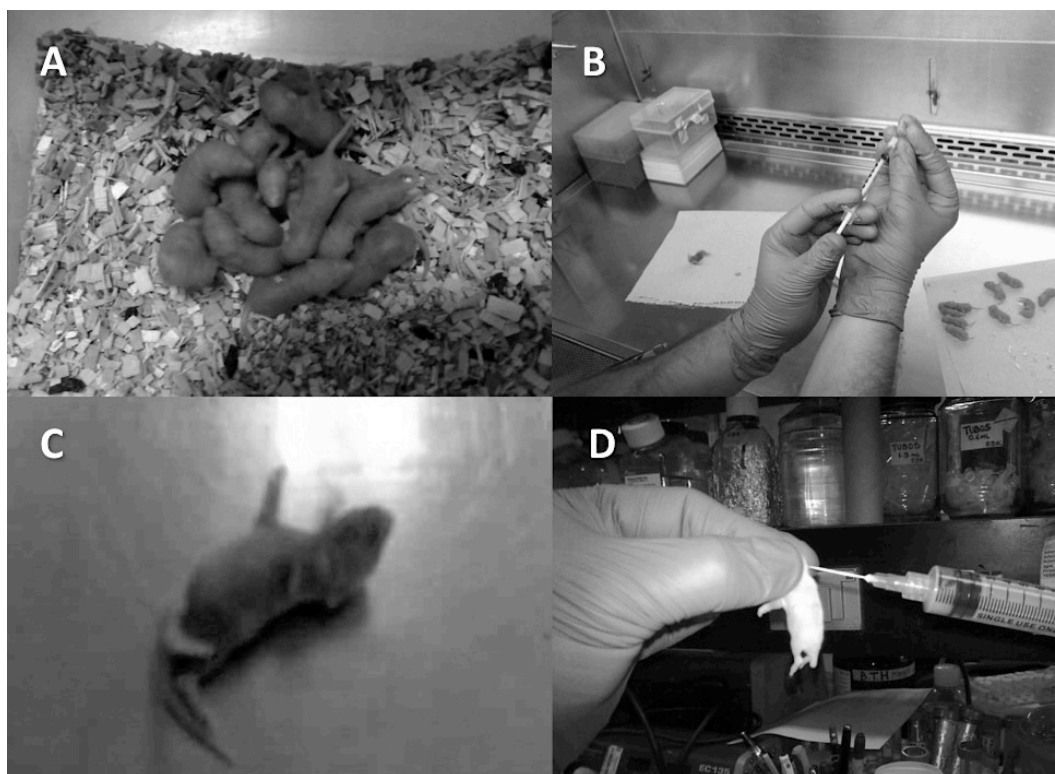


Figura 32. Procedimiento de inoculación intracerebral de dengue en ratones BALB/c lactantes, evolución de la infección y cosecha del cerebro para su posterior macerado.

Durante cinco días se permitió el establecimiento de la infección, revisando todos los días a los ratones lactantes, en los cuales se observó elevación de la temperatura corporal al tacto, convulsiones, dificultad de movimiento en las extremidades traseras, dificultad para erguirse y temblor fino. En los ratones inoculados con macerado de cerebro del primer pasaje se observaron los mismos síntomas pero con mayor intensidad, falleciendo algunos ratones incluso al día 3 post-inoculación.

Posterior al macerado y filtración, se realizó detección de NS1 (Dengue Ag NS1 Platelia, Bio-Rad) y titulación en células BHK21, observando saturación en el ELISA probablemente debido a una concentración muy alta de NS1. Los títulos virales obtenidos estuvieron en el rango de 10^3 a 10^6 . (**Tabla 20**)



TITULACIÓN VIRAL		CUANTIFICACIÓN DE NS1		
MUESTRA	TÍTULO (UFP/mL)	MUESTRA	PROMEDIOS Absorbancia	S/CO
4904	8.6×10^3	D1Y	0.958	2.85970149
D1Y	2.25×10^5	D1M	0.2895	0.8641791
D2Y	1.5×10^5	D2Y	0.1595	0.4761194
D1M	2×10^4	4904	0.328	0.97910448
DENV4	5×10^7	Cut off	0.335	1
		Control positivo	0.578	1.72537313
		Control negativo	0.1245	0.37164179
		DENV 4	-	saturación

Tabla 20. Titulación viral y cuantificación de NS1 de macerados de cerebro de ratón infectados con DENV.

Al comparar los títulos obtenidos en cultivo celular contra los dos pasajes en ratones lactantes, nos dimos cuenta que se redujeron. Se logró verificar que los aislados en cultivo tuvieron la capacidad para infectar un sistema *In vivo*, pero que la mejor opción para continuar produciendo partículas virales sería en cultivo en C6/36.

7.6. Evaluación de la infectividad y reproducibilidad de condiciones experimentales en cultivo celular.

Posterior a la titulación de los lotes de DENV (tanto prototipos virales como aislados de sujetos infectados), observamos que el efecto citopático de las monocapas de células BHK-21 parecía inducirse de forma diferencial. Decidimos hacer infección de las células BHK-21 a una MOI de 0.1 (placa de 24 pozos, 40000 células/pozo), permitiendo que el proceso infeccioso se estableciera en un periodo de 5 días. Transcurrido el tiempo se tiñeron las placas con Naphtol Blue Black (**Figura 33**).

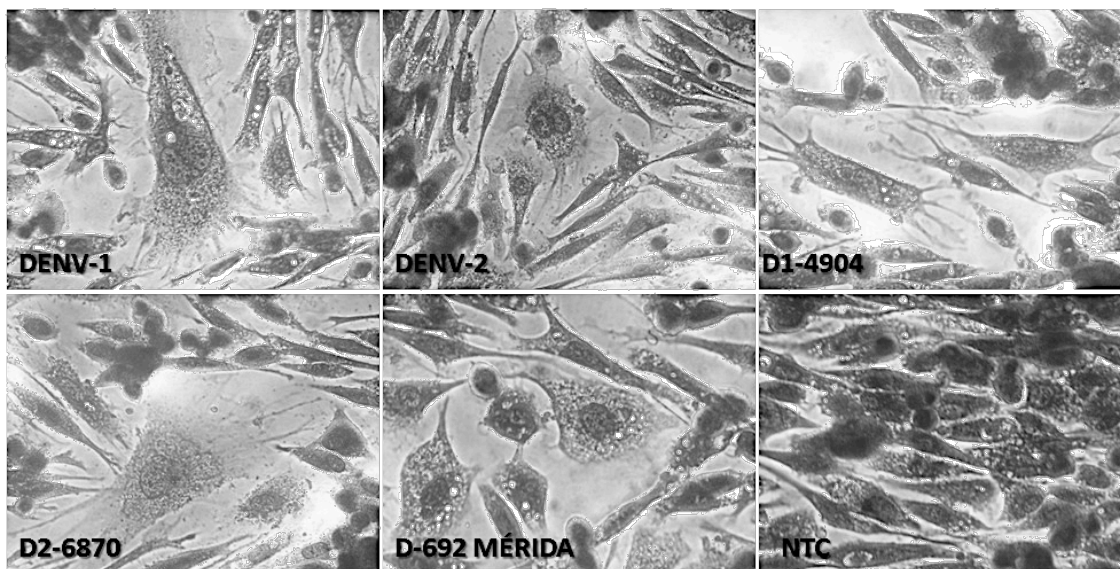


Figura 33. Infección de células BHK-21 con DENV prototipo y aislados de pacientes

El efecto citopático a una MOI y tiempo constantes se presentó de forma diferencial en células BHK-21. Al comparar contra las células no infectadas (que continuaron creciendo y proliferando de forma normal), se observó fusión celular, vacuolación, pérdida de la morfología celular normal, aparición de proyecciones citoplasmáticas y granulación en las zonas aledañas a los focos líticos. Se observó también que los virus podían inducir focos líticos con tamaños variables y al parecer, dependiente de la cepa: los aislados de pacientes produjeron focos líticos más pequeños que los prototipos virales en monocapas de células BHK-21.

Las mismas condiciones de infección se utilizaron para verificar si se podían reproducir los resultados en células Huh-7, las cuales son el sistema biológico en el cual se estudió la respuesta de interferón en esta tesis.

Las células Huh-7 se infectaron a una MOI de 0.1 (placa de 24 pozos, 40000 células/pozo) pero en lugar de permitir el transcurso de la infección durante 5 días, se realizó evaluación por microscopía a las 24, 48 y 72 horas post-infección (hpi). (**Figura 34**)

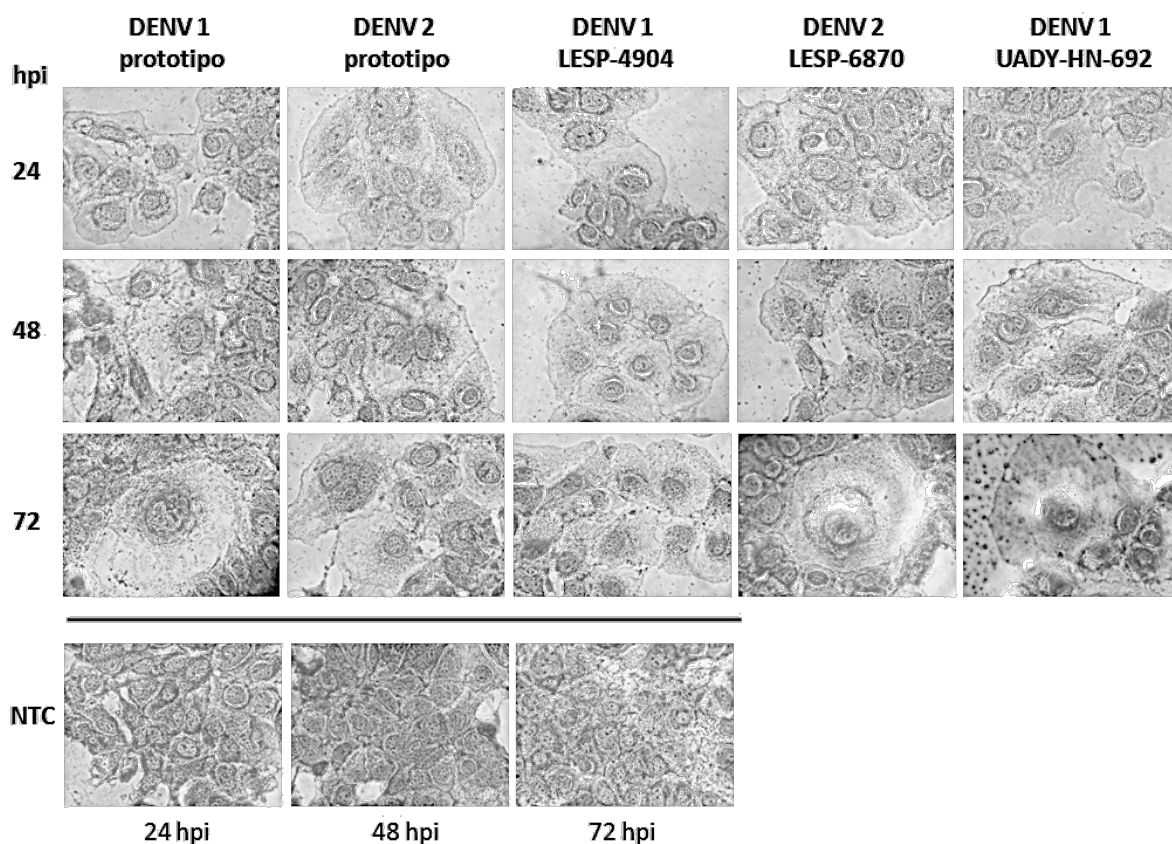
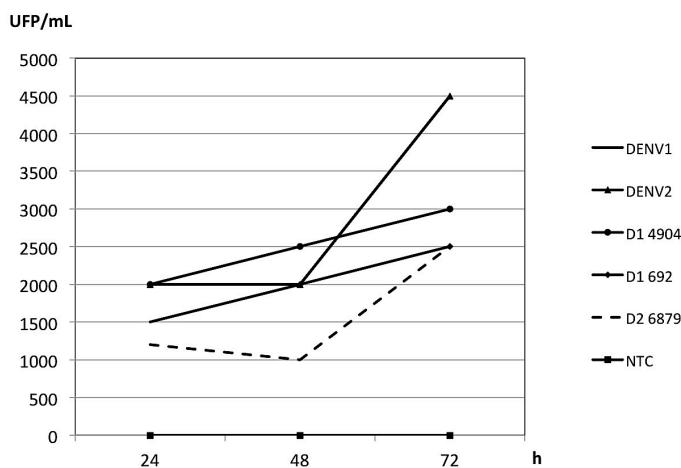


Figura 34. Infección de células Huh-7 con DENV prototipo y aislados de pacientes. Se evaluó morfología de la monocapa celular a las 24, 48 y 72 hpi.

Se confirmó que los virus aislados tienen la capacidad de inducir efecto citopático similar al que producen los virus prototipo. A MOI bajas, los resultados de infección fueron reproducibles, y el efecto citopático se presenta a tiempos tan tempranos como 24 hpi. Por lo tanto, los virus aislados a partir de pacientes parecieron mantener su infectividad y capacidad citopática en la línea celular Huh-7.

Adicionalmente a la evaluación por microscopía, se decidió cuantificar la cantidad de partículas virales nuevas (progenie viral) que se generaron en los sobrenadantes de los prototipos virales D1 y D2, así como de tres aislados (D1 4904, D2 6870 y D1 692). (**Figura 35**)



VIRUS	Progenie viral (UFP/mL)		
	24 hpi	48 hpi	72 hpi
D1 prot Hawaii	1500	2000	4500
D2 prot NGC	2000	2000	4500
D1 4904	2000	2500	3000
D2 6870	1500	1000	2500
D1 692	2000	2000	2500
NTC	0	0	0

Figura 35. Cuantificación de partículas virales producidas

Logramos observar que los virus prototipo producían una mayor cantidad de partículas infecciosas que los aislados de pacientes al infectar células Huh-7 cuando se comparaban con el serotipo homólogo. Al comparar los aislados de pacientes, las infecciones realizadas con virus serotificados como D1 generaron una mayor cantidad de partículas infecciosas que los serotificados como D2.

Después de observar la diferencia en la producción de partículas virales, decidimos evaluar la abundancia de STAT-1 en cultivos de células Huh-7 infectados con DENV, para comparar con los niveles basales de esta proteína en cultivos sin presencia de partículas virales. Se infectaron células

Huh-7 a una MOI de 0.01 con virus prototipo (D1 y D2), así como con aislados de pacientes D1-4904, D2-692, D2-694 y D1-696. Se permitió la infección viral durante 48 horas, tras lo cual se trataron las células infectadas con interferón alfa (IFN α , 1000 UI/mL, PEGASYS Peg-interferon alfa 2a, Genetech USA), durante una hora para inducir la respuesta de IFN.

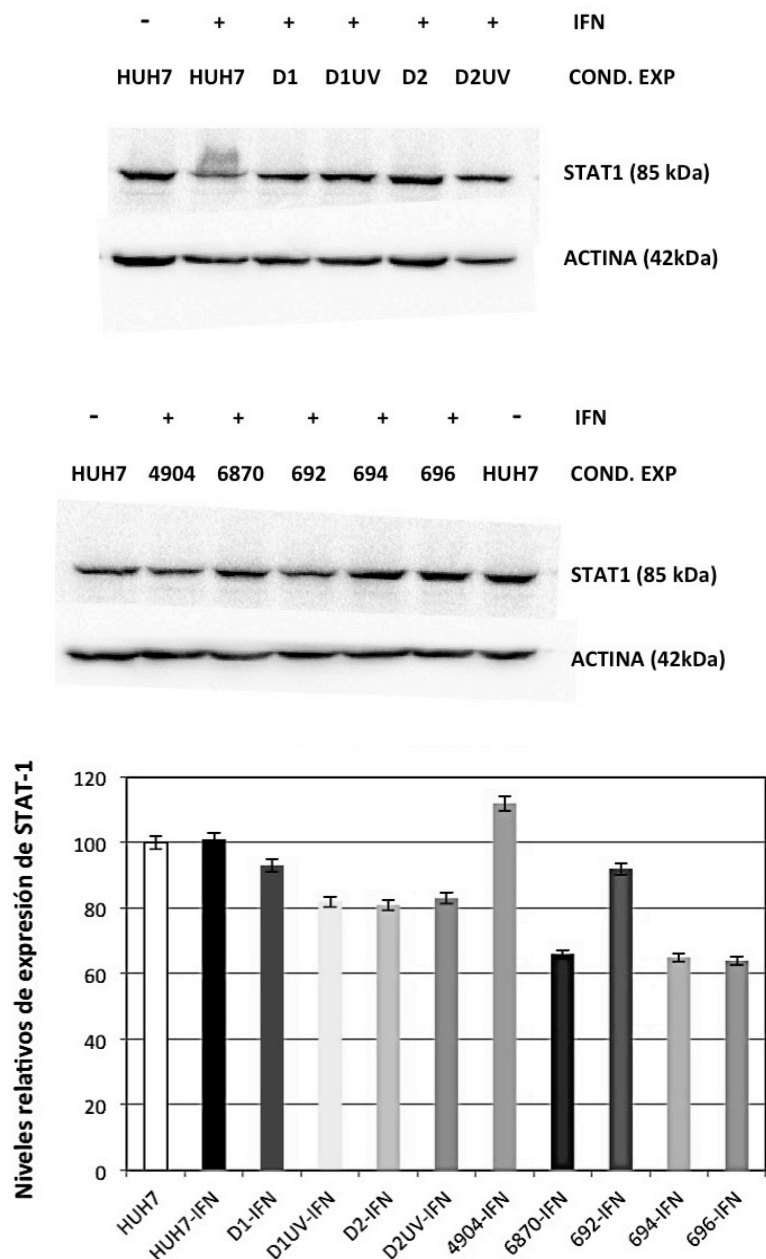


Figura 36. Evaluación en la inducción de STAT-1



Transcurrido el tiempo se retiró el medio y se extrajo proteína total, para posteriormente cuantificarla, hacer SDS-PAGE, transferirla a membrana de PVDC y marcar STAT-1 y Actina. Como controles se usaron prototipos D1 y D2 inactivados en luz UV durante 1 hora en hielo. La membrana se analizó por densitometría para comparar la abundancia relativa de STAT-1. (**Figura 36**)

Los virus prototipo y las cepas aisladas de sujetos infectados parecen tener diferente capacidad para modular la respuesta de interferón: En general la mayoría de las cepas modularon negativamente la producción de STAT-1 a 36 hpi: aislado 6870 disminuyó un 30%, 692 un 7.2%; 694 un 34.7% y 696 un 35.4%; mientras que el aislado 4904 no redujo la producción de STAT-1 (112%), todas con respecto a la expresión basal de esta proteína en las células Huh-7 post-tratamiento con IFN α . No se observó diferencia entre la reducción de STAT-1 en los virus prototipo contra los inactivados con luz UV.

7.7. Evaluación de la respuesta de interferón por medio de arreglos de qPCR.

Después de observar que la infección con DENV parecía modular de forma diferencial la abundancia de STAT-1 y posiblemente la respuesta de IFN en cepas virales circulantes en México, decidimos evaluar la expresión de genes involucrados en la respuesta antiviral de Interferón tipo I. La **figura 37** muestra el diseño experimental empleado para cumplir el objetivo: En placas de 6 pozos se sembraron 300,000 células por pozo, las cuales se infectaron bajo las condiciones indicadas a una MOI de 0.01. Se permitió que la infección se estableciera durante 48 horas, tras lo cual se removió el medio y se realizó el tratamiento con IFN α (1000 UI/mL) durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, se extrajo el RNA con el RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN). Los RNA se cuantificaron por espectrofotometría (Nanodrop 2000, Thermo Scientific) y se evaluó su integridad por electroforesis capilar (Experion).

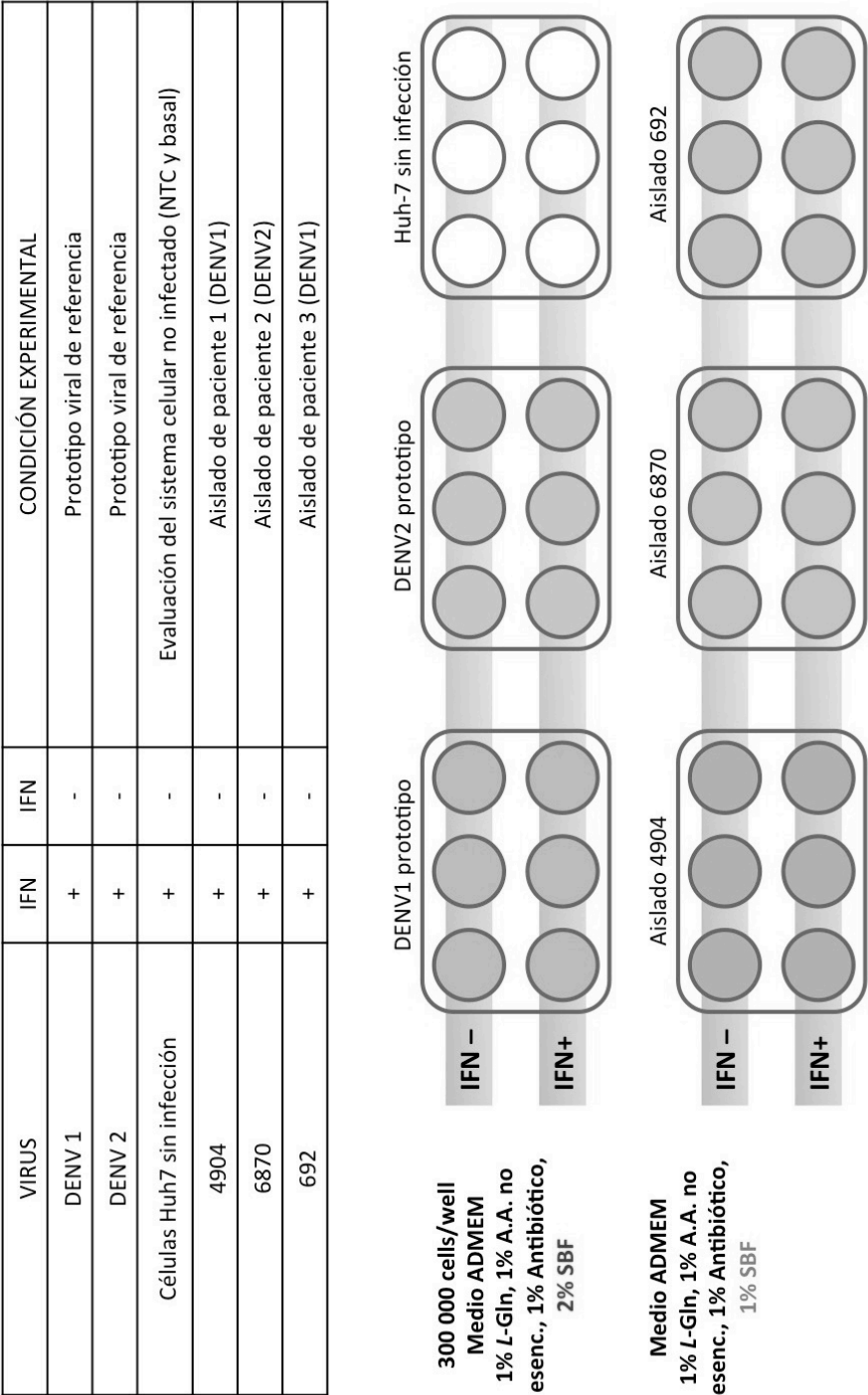


Figura 37. Diseño experimental de la infección con DENV y tratamiento con IFN.

Los parámetros de calidad del RNA considerados fueron: Relación A260:A230 > 1.7, relación A260:A280 con un valor entre 1.8 y 2.0 y la concentración determinada por A260 > 40 µg/mL. Los parámetros de los RNAs extraídos se muestran en la **tabla 21** y los resultados de la electroforesis capilar se muestran en la **figura 38**.

	Condición experimental	Concentración (ng/µl)	Total obtenido (ng/µl)	A260	A280	260/280	260/230
1	HUH7	156.4	3910	3.91	1.878	2.08	2.15
2	D1	127.8	3195	3.196	1.479	2.16	2.21
3	D2	105.7	2642.5	2.644	1.221	2.17	1.72
4	D4904	178.6	4465	4.466	2.111	2.12	2.15
5	D6870	172.4	4310	4.309	2.036	2.12	1.96
6	D692	177.6	4440	4.441	2.082	2.13	1.7
7	HUH7+IFN	184.9	4622.5	4.622	2.208	2.09	2.02
8	D1+IFN	101.7	2542.5	2.543	1.18	2.16	2.1
9	D2+IFN	104.8	2620	2.62	1.216	2.16	2.27
10	D4904+IFN	197.1	4927.5	4.928	2.341	2.11	2.33
11	D6870+IFN	168	4200	4.199	1.971	2.13	1.89
12	D692+IFN	160.5	4012.5	4.012	1.905	2.11	2.29

Tabla 21. Concentración y parámetros de calidad de los RNAs extraídos.

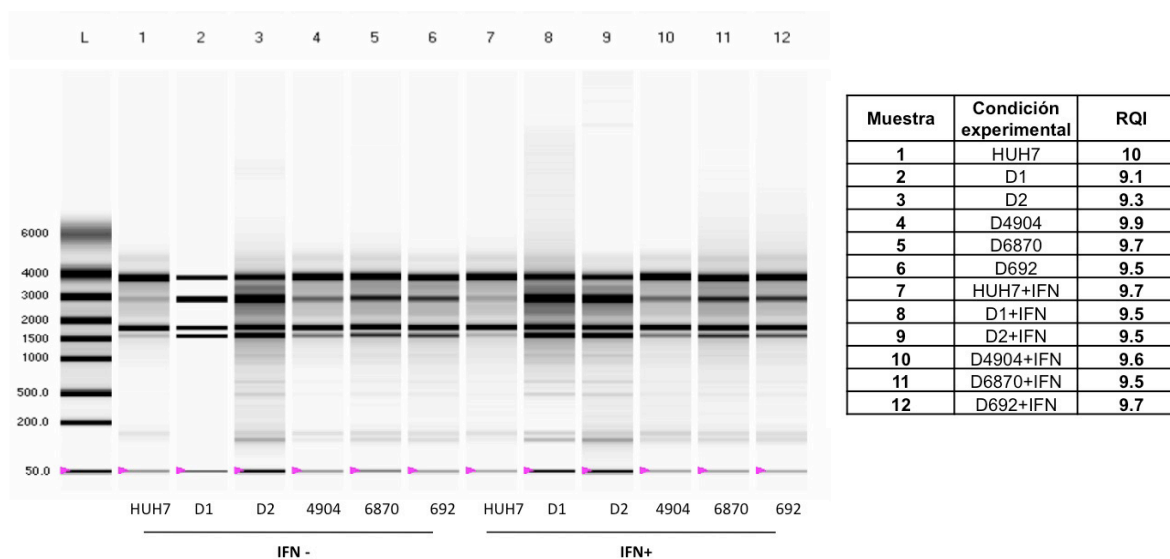


Figura 38. Electroforesis capilar de los RNAs extraídos.



El sistema Experion permitió calcular el RQI, parámetro de calidad relacionado con la integridad del RNA evaluado. Para el montaje de los arreglos de PCR se requiere que los RQI de los RNA a evaluar tengan un valor mayor o igual a 7. Los RNAs que se extrajeron presentaron RQI superiores a 9 y muy cercanos a 10, lo que nos aseguró que el material genético estaba en concentración e integridad óptimas.

Se retrotranscribió 1 µg de cada uno de los RNAs (kit RT² First Strand Kit, QIAGEN) y se montó la mezcla con el master mix (RT² SYBR[®] Green ROX qPCR Mastermix (QIAGEN). Todo bajo las condiciones indicadas por el proveedor descritas en el RT² Profiler PCR Array Handbook (QIAGEN).

El análisis bioinformático permitió distinguir que la mayoría de genes se encontraban sobreexpresados (**Figura 39**) y a partir de los datos de la plataforma online, se obtuvieron los Fold Change para cada uno de los genes en cada condición experimental. Para facilitar la interpretación de los datos, se generaron esquemas estilo 'nubes de palabras' (*word clouds*) donde el tamaño del nombre del gen es proporcional al número de veces que se encuentra sobreexpresado. (**Figuras 40 y 41**).

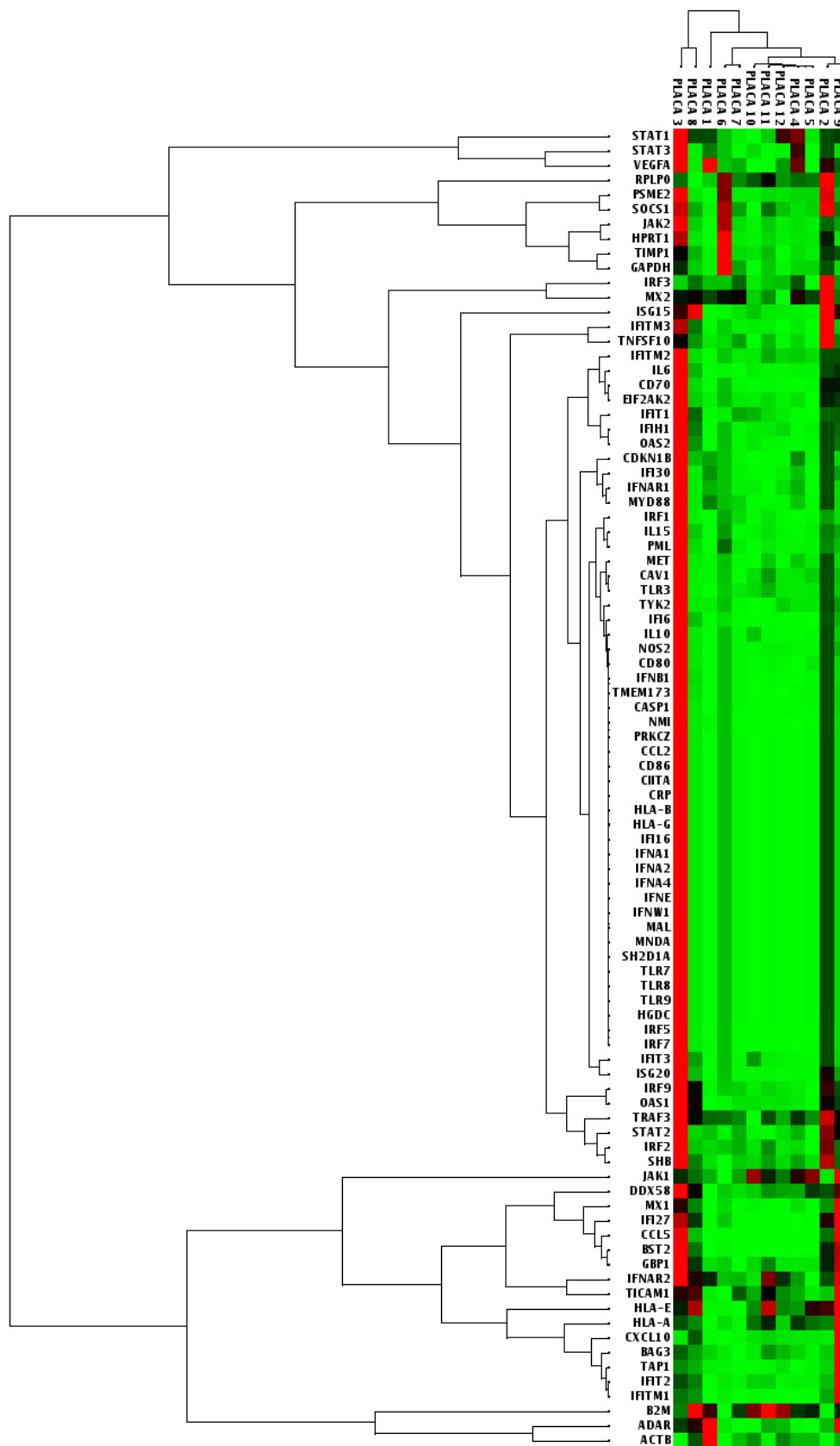


Figura 39. Mapa de calor de los genes modulados por IFN

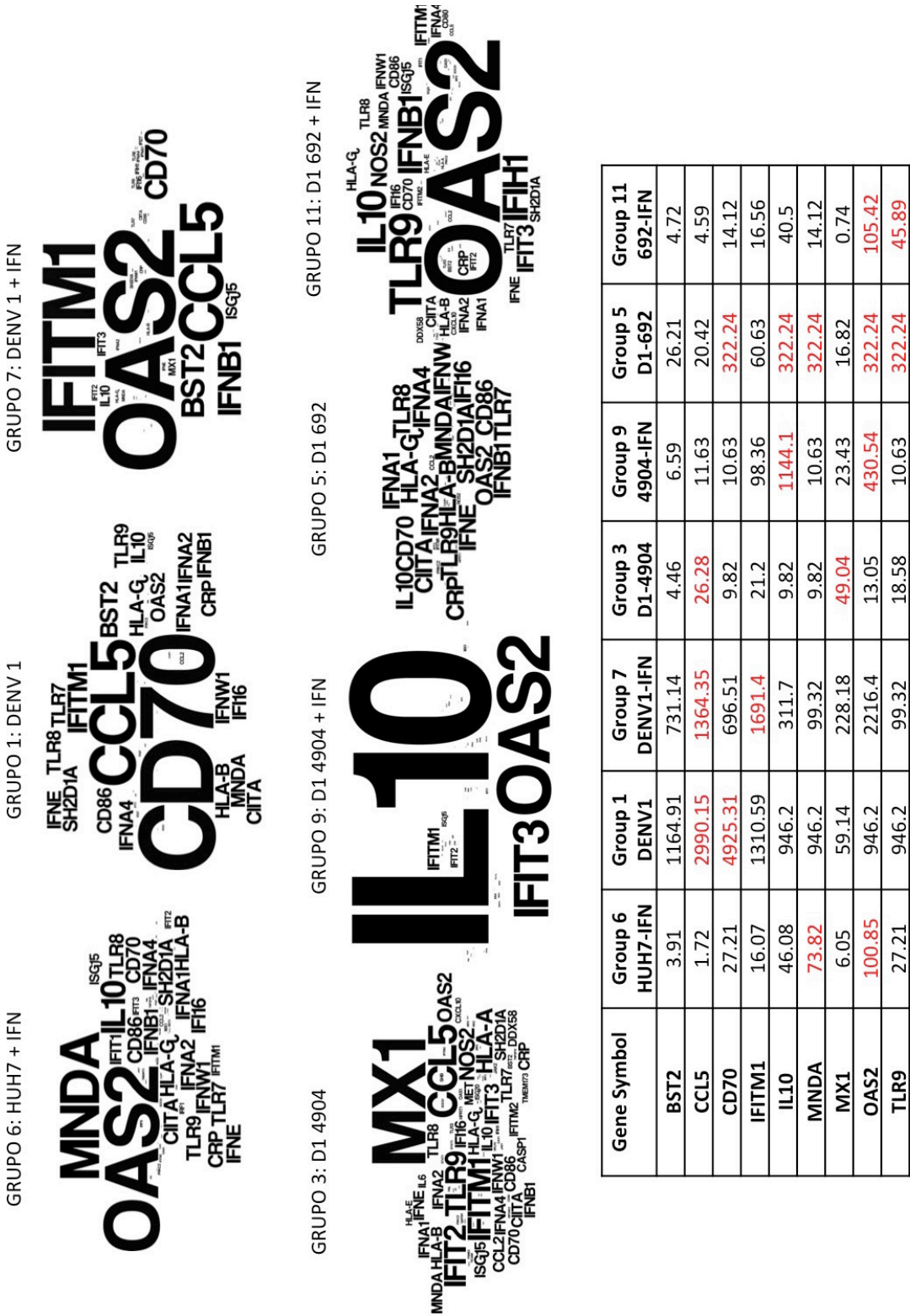


Figura 40. Esquemas de ‘nubes de palabras’ en cultivos de células Huh-7 infectados con DENV1

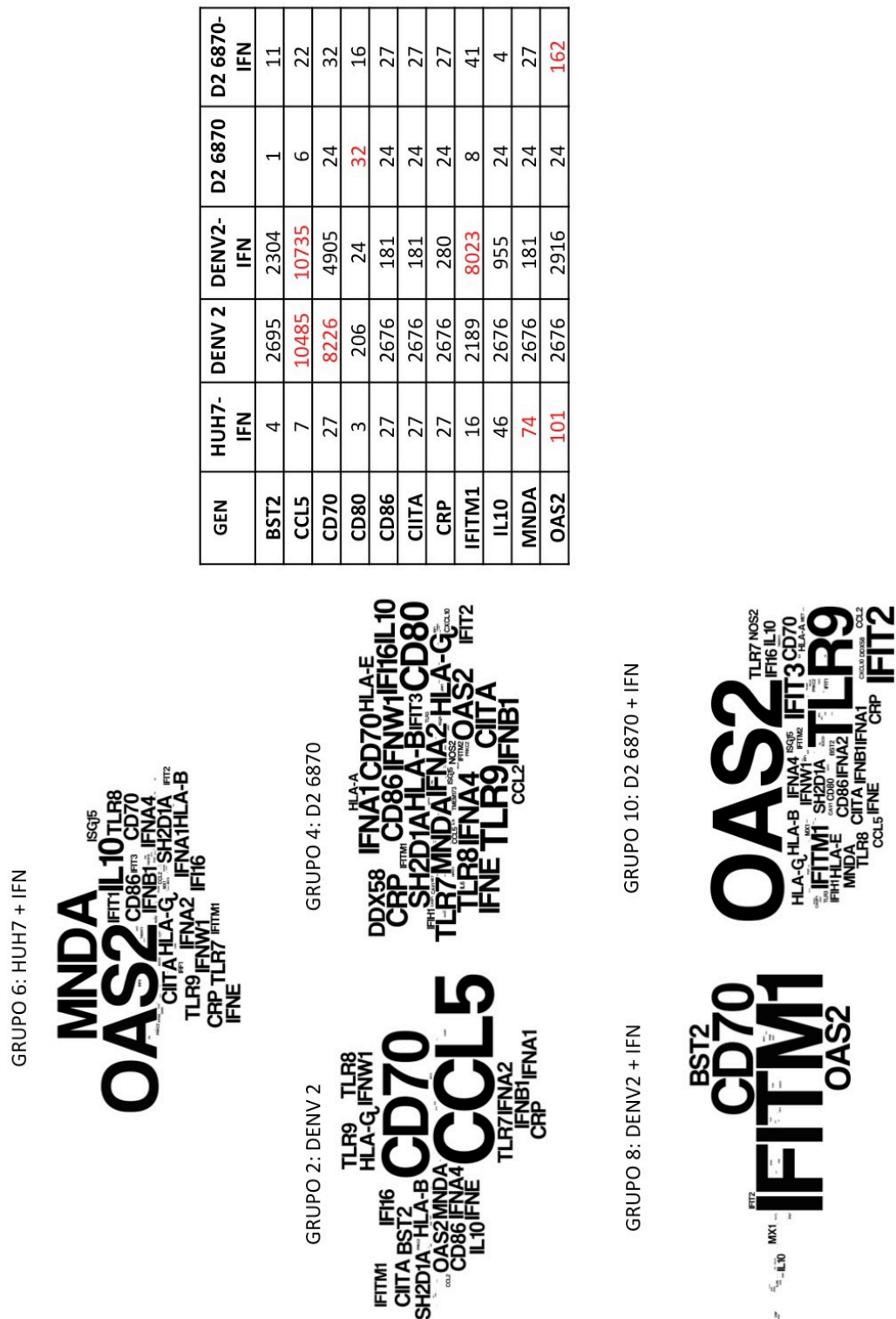


Figura 41. Esquemas de ‘nubes de palabras’ en cultivos de células Huh-7 infectados con DENV2.

CAPÍTULO VIII

DISCUSIÓN



El dengue es un problema creciente de salud pública que afecta a más de 100 países en el mundo, con más de 50 millones de casos informados cada año, incluidos 500.000 hospitalizaciones y alrededor de 20.000 defunciones. Los cuatro serotipos virales, están circulando de forma simultánea en el continente Americano, con una incidencia en aumento de forma explosiva.¹⁰

Según la OPS, el incremento de los viajes aéreos, las condiciones climáticas, la urbanización no planificada, las dificultades en el abastecimiento de agua, sumados al deterioro de los programas de control del vector, la carencia de insecticidas con buena relación de costo/efectividad y la falta de educación sanitaria son algunos de los factores relacionados a la diseminación del *Aedes aegypti* y al incremento en la circulación de los cuatro serotipos del virus.¹⁸⁹

La falta de tratamiento y profilaxis señala la necesidad primaria de la búsqueda de principios activos que tengan la capacidad de interferir con la replicación viral para poder evitar la evolución de una fiebre autolimitada a un síndrome hemorrágico. Por lo tanto es de fundamental importancia el estudio de aquellos factores que se encuentran involucrados en el proceso de replicación viral empleando sistemas de estudio *In vitro*.

En la presente tesis doctoral se analizó primero el panorama nacional de los casos positivos de dengue, para después hacer una descripción de la situación estatal en Nuevo León, tanto en sujetos con cuadro sintomático como en pacientes asintomáticos. A partir de los casos sintomáticos se logró



el aislamiento de partículas virales infecciosas que se probaron en sistemas celulares para identificar el patrón de expresión génica que inducen en el hospedero para modular la respuesta antiviral innata (respuesta de interferón).

Inicialmente se analizaron los casos de dengue en México, observando que entre la semana epidemiológica 30 y 45 (el tercer cuarto de cada año) se presentó el aumento en los casos totales de dengue, y que el fenómeno se ha mantenido constante, alcanzando los picos máximos entre las semanas 36 a 40. 2009 es el año que había reportado los máximos históricos nacionales¹⁹⁰, para posteriormente haber una disminución y en el 2013 presentarse un repunte casi de la misma magnitud en el total de casos confirmados. La temporada anual con mayor incidencia en infecciones con DENV parece por lo tanto ser el periodo comprendido entre finales del verano y mediados de otoño.

El estado de Nuevo León en el periodo 2008-2013, subió del lugar 12 al quinto lugar nacional, aportando 7.7% de los casos que se registran en todo el país, cuando cinco años antes aportaba únicamente el 2%.

Nuevo León tradicionalmente se ha caracterizado junto con la zona noreste del país, como un territorio seco y árido. El cambio climático y el aumento en las precipitaciones y humedad ambiental pudieran ser factores que lo han convertido gradualmente en una región endémica a la presencia del vector (observación reportada previamente por nuestro grupo de investigación)¹⁹¹ y por lo tanto, al incremento en el número de casos registrados. Los resultados analizados parecen indicar que efectivamente hay un repunte en el total de casos de dengue reportados cada tres años y que el aumento en el total semanal ha sido hasta de dos veces más que en el periodo de tres años anterior. Posiblemente esto se pueda deber al aumento en la conciencia clínica y social frente a los casos de dengue, a la consulta médica oportuna y



al arduo trabajo realizado por el NL-LESP en el proceso de confirmación de casos.¹⁹² Sin embargo todo esto describe únicamente el panorama de cuadros sintomáticos, los cuales se han reportado que representan cerca del 20% de las infecciones con DENV (80% de las infecciones son asintomáticas).¹⁷⁶

Al momento de estudiar individuos asintomáticos y presuntivamente sanos, se encontró evidencia de la presencia del DENV en una población de donantes de sangre. Los resultados obtenidos indicaron que 2.6% de los donadores fueron clasificados como casos probables de infección asintomática con base en criterios de laboratorio.

La seroprevalencia en pacientes asintomáticos aumentó un 30% en el transcurso de 5 años: del 2% en el 2007 al 2.6% en 2010-2012.¹¹⁸ La seroprevalencia encontrada en la población de estudio incrementa el riesgo de que los paquetes de sangre puedan ser recolectados a partir de donantes vírémicos asintomáticos o en fase subclínica de infección. Nuestros resultados parecen indicar que en el estado de Nuevo León existe un riesgo de transmisión de la infección con DENV por recepción de sangre contaminada, casi 3 veces más alto que para *Treponema pallidum*, 4 veces más alto que la posibilidad de infectarse con HCV e incluso 14 veces más alto que la posibilidad de adquirir HIV por vía transfusional.

En muchos países endémicos la infección con DENV asociada a transfusión no se ha reconocido como un problema debido posiblemente a la falta de conciencia de que el virus puede transmitirse por otros mecanismos diferentes al vector, pudiéndose esto verse reflejado en el incremento de los casos a nivel mundial.¹⁹³ Debido a que en la NOM actual de manejo de sangre con fines terapéuticos (NOM-253-SSA1-2012) no se encuentra contemplado el diagnóstico de dengue, la transfusión en zonas endémicas representa un alto riesgo de diseminación de la infección por DENV.



Debido a que a partir de los donantes asintomáticos no se logró rescatar ninguna partícula viral, decidimos evaluar sueros de sujetos infectados trabajando en colaboración con el LESP-NL. En el periodo de septiembre 2010 a diciembre 2013 se recolectaron 2145 sueros, de los cuales 386 fueron positivos para DENV NS1.

Al georreferenciar la ubicación de cada uno de los casos estatales, se encontró que se generaba una agrupación (*cluster*) correspondiente a la zona metropolitana de Monterrey. Los municipios que reportaron una mayor incidencia de casos fueron Monterrey (352), Linares (248), Montemorelos (238) y Guadalupe (201), y se ubicaron en colonias cercanas a zonas con vegetación y temperaturas templadas, así como próximas a cuerpos de agua. El grupo de edades que resultó más afectado fue el correspondiente a personas entre 18 y 40 años (36.4%), seguidos de población entre 40 y 60 años (28.1), En su mayor parte fueron mujeres (66.9%), haciendo una proporción aproximada de 2:1 en la incidencia mujeres:hombres.

A partir de los sueros DENV NS1 positivos potencialmente virémicos se aislaron 6 virus tipo 1, 6 tipo 2 y 1 tipo 4, los cuales se caracterizaron por métodos moleculares para garantizar el haber obtenido cepas diferentes y de serotipo único (no coinfección). Todos los virus aislados corresponden a cuadros de dengue clásico y el tiempo de toma de muestra post-aparición de los síntomas no excedió los tres días. Los virus aislados son infectivamente funcionales, capaces de generar enfermedad en sistemas *In vivo* y de infectar líneas celulares con reproducibilidad.

Al infectar la línea Huh-7 con DENV prototipo y DENV aislados de paciente, se encontró que las células se infectaban a tiempos cortos y que se puede detectar efecto citopático en las monocapas a tiempos cortos (24 hpi). Se observó que los virus prototipo generan una mayor progenie viral, posiblemente debido a que se encuentran adaptados a crecimiento en líneas



celulares. Se ha reportado que el DENV debe cursar con un proceso de adaptación cuando pasa de un hospedero a otro, lo que pudiera ser un factor que module el potencial infectivo de las cepas circulantes.¹⁹⁴

Muchos patógenos virales circulan entre humanos e insectos. Estos virus deben presentar estrategias evolutivas para la adaptación rápida a diferentes ambientes relacionados al hospedero que infectan. Sin embargo, los mecanismos moleculares de este fenómeno no se conocen completamente. Villordo y colaboradores examinaron cambios en la estructura de RNA del genoma de DENV durante el proceso de adaptación al hospedero. La secuenciación profunda y el análisis de la estructura de RNA, adicional a la evaluación de aptitud, revelaron un proceso de especialización al nivel de la estructura de la región 3'-UTR del genoma de DENV, y la presencia de una secuencia específica¹⁹⁴ Esta secuencia en 3'UTR es necesaria para la replicación en mosquitos pero no en humanos, y tiene la capacidad de formar una pequeña horquilla, siendo la primera secuencia identificada en un flavivirus que se requiere con exclusividad para la replicación en el vector.¹⁹⁵

Estos procesos de adaptación en la secuencia del DENV cuando cambia de hospedero, también pueden inducir variaciones en las secuencias genómicas ligadas a la falta de corrección de la polimerasa viral, existiendo la posibilidad de una modulación positiva o negativa en su capacidad infectante y posiblemente en la presentación del cuadro clínico en pacientes humanos, sugiriendo que cada cepa viral tiene un potencial diferencial para el posible pronóstico clínico, como lo reportó Umareddy.¹⁷⁴

Usando virus de bajo pasaje aislados a partir de sueros virémicos, infectamos la línea celular Huh-7 y se encontró que los virus tienen una modulación diferencial para STAT-1, lo que sugirió que pudieran generar una respuesta de interferón característica de cada cepa. Se ha reportado que la infección con el DENV induce el aumento en la producción y fosforilación de



STAT-1, IFN, IFIT-1/ISG56 y viperina.¹⁹⁶ Nosotros encontramos que no todas las cepas virales indujeron el aumento en la producción de STAT-1 posterior al tratamiento con IFN α . Al comparar los niveles basales de STAT-1 en células Huh-7 (100% STAT-1), los prototipos virales redujeron la abundancia de STAT-1 en un 7% para DENV 1 (93% STAT-1), en un 19% para DENV2 (81% STAT-1) mientras que de los aislados virales sólo D1-4904 aumentó los niveles de STAT-1 en un 12% (112% STAT-1). Los demás aislados de pacientes presentaron una reducción en la abundancia de STAT-1 del 8 al 36%, donde el aislado D1-696 fue el que presentó la abundancia más baja de STAT-1 (64% en comparación a las células sin infección). Esta observación resulta interesante debido a que se ha reportado que STAT-1 es fundamental para la depuración de la carga viral inicial, mientras que se han reportado mecanismos de control independientes a STAT-1.¹⁹⁷ Esto nos hizo pensar que la capacidad de modular una proteína importante en la señalización por IFN pudiera también estar modulando la expresión génica y el establecimiento de estado antiviral.

Empleando arreglos de qPCR dirigidos contra genes relacionados con la respuesta de IFN tipo I, se analizaron 84 genes involucrados con la inducción, producción y actividad antiviral del interferón, y se encontró que tanto los virus aislados de pacientes como los prototipos virales indujeron la expresión de la mayoría de ellos con diferente grado de intensidad. Los mapas de calor generados por la plataforma indicaron una sobreexpresión en general de la mayoría de los 84 genes.

Los genes sobreexpresados en mayor magnitud por las células infectadas con DENV 1 fueron CCL5, CD70, IFITm1, IL10, MNDA, MX1, OAS2 y TLR9. El nivel de sobreexpresión fue variable, aunque se mantuvo constante que en la mayoría de los casos los virus prototipo presentaban niveles más altos de expresión que los aislados de pacientes. CCL5 (RANTES) fue sobreexpresado 2990.15 veces más que el control sin infección, pero la



expresión de este gen se redujo a la mitad post-tratamiento con IFN. Se sabe que CCL5 tiene la capacidad para interactuar con CCR3, CCR5 y CCR1¹⁹⁸. Se sabe que el DENV tiene la capacidad de incrementar la producción de RANTES incrementando la unión de NF- κ B a sus sitios de interacción sobre el promotor de CCL5 como consecuencia de la unión de DENV NS5.¹⁹⁹ El aislado de paciente D1 692 indujo la expresión de TLR9 con mayor magnitud que los otros virus. TLR9 señala a las células vecinas para iniciar las reacciones pro-inflamatorias que resultan en la producción de IFN tipo I e IL-12.²⁰⁰ Se ha descrito que la sobreexpresión de TLR9 en la infección con DENV se relaciona con cuadros no complicados.²⁰⁰

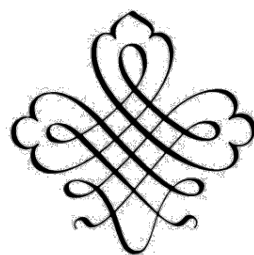
En el caso de los cultivos infectados con DENV2, el prototipo DENV2 NGC indujo 115 veces más IFN α que DENV2-6870, sin embargo al tratar con IFN α el prototipo redujo la expresión de IFN al 6%, mientras que DENV2-6870 lo incrementó al 112%. Los genes más inducidos por DENV2NG fueron BST2, CCL5 y CD70, mientras que los más inducidos por DENV2-6870 fueron IFITM1, CD70 y OAS2. La diferencia de expresión en CCL5 fue muy amplia, donde el prototipo lo indujo 10000 veces, mientras que el aislado de paciente lo hizo únicamente 6 veces. Resultó interesante observar que después del tratamiento con IFN, la inducción de genes relacionados con estrés oxidativo aumentó 100 veces más que en los controles sin infección.

Se ha observado que los patrones de expresión génica como respuesta a la infección con DENV son muy variables, y parecieran correlacionarse con el pronóstico de la presentación clínica. Algunos genes que se han reportado como subexpresados son TNF α (TNF), IL8, C1S, IL2, IL3, IL4, IL5, IL9, IL10, IL13, CD80, CD28, MMP10, MMP12, MMP15, MMP16 y MMP24. Los genes que se han observado sobreexpresados en la infección con DENV son RANTES (CCL5), MIP-1 α (CCL3L1/CCL3L3), MIP-1 β (CCL4L1); TGF β y TIMP1.¹⁷⁶



Por lo tanto, se observó que las cepas aisladas inducen diferentes niveles de expresión en los ISG. Los DENV prototipo y aislados de pacientes tuvieron capacidades diferentes para reducir el efecto del tratamiento con interferón, observando como múltiples ISG redujeron su expresión mientras las células estaban infectadas. Los virus serotipo 2 indujeron niveles de expresión más altos que los virus serotipo 1, lo cual pudiera dar indicio de la razón por la cual clínicamente la infección con DENV2 es más agresiva en comparación con los otros tres serotipos.²⁰¹

En los últimos cinco años se ha aprendido mucho sobre los mecanismos moleculares que el DENV emplea para poder completar su ciclo de replicación. El camino para el entendimiento total es largo pero cada vez nos encontramos más cerca de obtener datos concluyentes. El presente trabajo representa el primer estudio de expresión a nivel nacional que se realiza con cepas circulantes en el país aisladas a partir de pacientes virémicos.



CAPÍTULO IX

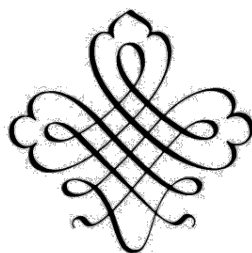
CONCLUSIONES



1. En el periodo 2008-2013, el estado de Nuevo León se ubicó en 5° lugar nacional, aportando 7.7% de los casos que se registran en todo el país, lo cual es relevante ya que en los cinco años anteriores aportaba únicamente el 2%.
2. La prevalencia anual de dengue en Nuevo León es variable, presentando picos de alta prevalencia cada tres años, con el mayor número de casos en los meses de agosto a noviembre y en su mayoría con presentación clínica clásica (más del 50% de los casos totales, en el año 2013).
3. Los casos asintomáticos representan un riesgo de transmisión de DENV, que se evidencia con el hallazgo e incremento del 2 al 2.6 % de marcadores de fase aguda para DENV en donadores de sangre de NL.
4. Debido a que en la NOM-253-SSA-1-2012 que versa sobre el manejo actual de sangre con fines terapéuticos no incluye tamizaje para dengue, este hallazgo resalta el riesgo continuo de adquirir la infección mediante transfusión de hemoderivados en zonas endémicas por DENV además de la transmisión por vector.
5. Se aislaron 13 virus a partir de sujetos virémicos: 6 DENV-1, 6 DENV-2 y 1 DENV-4. Todos se caracterizaron por métodos moleculares para garantizar el haber obtenido cepas diferentes y de serotipo único. Los virus aislados son funcionales, capaces de generar enfermedad en sistemas *In vivo* y de infectar líneas celulares.



6. Los DENV aislados tienen la capacidad de generar efecto citopático a MOI bajas. Se observó que las células se infectan a tiempos cortos y que los aislados de pacientes replican de forma más lenta que los virus prototipo, generando una menor progenie viral en periodos similares de infección.
7. Se encontró que los virus aislados presentaron una modulación diferencial para STAT-1, lo que sugirió que pudieran generar una respuesta de interferón característica de cada cepa.
8. Al evaluar la respuesta de IFN por arreglos de qRT-PCR, se observó que las cepas DENV aisladas de pacientes exhiben una expresión diferencial de los genes ISG comparados con las cepas prototipo.
9. Los DENV prototipo y aislados de pacientes tuvieron capacidades diferentes para reducir el efecto del tratamiento con interferón, observando como múltiples ISG (como OAS2, IL10, MX1, CCL5) modularon su expresión en células infectadas.
10. Los virus serotipo 2 indujeron niveles de expresión más altos que los virus serotipo 1, lo cual podría en parte explicar clínicamente porque la infección con DENV2 es más agresiva en comparación con los otros tres serotipos.





CAPÍTULO X

BIBLIOGRAFÍA



- 1 San Martin JL, Brathwaite O, et al. (2010). "The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality." *Am J Trop Med Hyg* 82(1): 128-135.
- 2 Teyssou R (2009). "Dengue fever: from disease to vaccination." *Med Trop (Mars)* 69(4): 333-334.
- 3 Guzman MG, Kouri G. (2002) "Dengue: an update". *Lancet Infect Dis.* 2(1): 33-42.
- 4 Dengue fever Essential Data. CBWInfo Inc. 1999.
<http://www.cbwinfo.com/Biological/Pathogens/DENV.html>
- 5 (2006) "Dengue Etymology" *Emerging Infectious Diseases*, 12(6): 893.
<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol12no06/pdfs/etymology.pdf>.
- 6 Barrett AD, Stanberry LR (2009). *Vaccines for biodefense and emerging and neglected diseases*. San Diego: Academic. pp. 287–323
- 7 Halstead, SB (2008). *Dengue (Tropical Medicine: Science and Practice)*. River Edge, N.J: Imperial College Press. pp. 1–10.
- 8 Programa de Acción Específico para Dengue 2007-2010. Secretaría de Salud. CENAVECE. México.
- 9 Esler D (2009). "Dengue - Clinical and public health ramifications." *Aust Fam Physician* 38(11): 876-879.
- 10 Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. (2009). Organización Mundial de la salud
- 11 Secretaría de Salud. Manual para la prevención y control del dengue. México, 2002.
- 12 WHO. "Dengue fever and dengue haemorrhagic fever prevention and control. World Health Assembly Resolution WHA55.17, adopted by the 55th World Health Assembly", (2002) (http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA55/ewha5517.pdf).
- 13 WHO. "Dengue and dengue haemorrhagic fever. Factsheet No 117", revised May 2008. Geneva, (2008) World Health Organization
(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>)
- 14 WHO. "Revision of the International Health Regulations. World Health Assembly Resolution WHA58.3, adopted by the 58th World Health Assembly", (2005) (http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA58/WHA58_3-en.pdf).
- 15 Badii MHJ, Landeros J, Cerna E, Abreu JL (2007) "Bionomía y epidemiología del dengue". *Daena International Journal of good conscience*, 2(2)
- 16 <http://cenavece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/dengue/serotiposcirculantes.html>
- 17 <http://cenavece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/dengue/porcentajeserotipos.html>
- 18 "Panorama epidemiológico de fiebre de dengue y fiebre hemorrágica por dengue en entidades federativas". Semana 49 del año 2010. Secretaría de Salud, México.
- 19 Lorono-Pino MA, Farfan-Ale JA. et al. (2004). "Introduction of the American/Asian genotype of dengue 2 virus into the Yucatan State of Mexico." *Am J Trop Med Hyg*, 71(4): 485-492
- 20 CENAVECE Situación de Dengue en México, 2009.
<http://cenavece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/dengue/situacionmexico.html>



- 21 Dhananjeyan KJ, Paramasivan R, Tewari SC, Rajendran R, Thenmozhi V, Victor Jerald LS, Venkatesh A, Tyagi BK. (2010) "Molecular identification of mosquito vectors using genomic DNA isolated from eggshells, larval and pupal exuvium." *Trop Biomed.* Apr;27(1):47-53.
- 22 Lifson AR. (1996) "Mosquitoes, models, and dengue." *Lancet.* May 4;347(9010):1201-2.
- 23 Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, and Murphy BR. (2007) "Prospects for a dengue virus vaccine". *Nature Reviews Microbiology.* 5: 518-528.
- 25 Vasilakis N, Cardoso J, Hanlek KA, Holmes EC, Weaver SC. (2011) "Fever from the forest: prospects for the continued emergence of dengue virus and its impact on public health". *Nature Reviews Microbiology* 9, 532-541.
- 26 Chakraborty T (2008) "Dengue Fever and other Hemorrhagic viruses". Chelsea House, Infobase publishing. pp.20-23.
- 27 Azevedo LS, Carvalho DB, Matuck T, et al. (2007) "Dengue in renal transplant patients: a retrospective analysis". *Transplantation.* 84:792-794.
- 26 Chen LH, Wilson ME. (2004) "Transmission of dengue virus without a mosquito vector: nosocomial mucocutaneous transmission and other routes of transmission". *Clin Infect Dis.* 39(6):e56-60.
- 27 Chen LH, Wilson ME. (2005) Nosocomial dengue by mucocutaneous transmission. *Emerg Infect Dis,* 11(5):775.
- 28 de Wazières B, Gil H, Vuitton DA, Dupond JL. (1998) "Nosocomial transmission of dengue from a needlestick injury". *Lancet.* 351(9101):498.
- 29 CDC Traveler's yellow book. Dengue fever.
<http://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2010/chapter-5/dengue-fever-dengue-hemorrhagic-fever.aspx>
- 30 Apisarnthanarak A, Mundy LM. (2009) "Is dengue virus infection an occupational health problem?" *Clin Infect Dis.* 48(1):135-7.
- 31 Teo D, Ng LC, Lam S (2009) "Is dengue a threat to the blood supply?" *Transfus Med,* 19(2): 66-77.
- 32 Fatimil LE, Mollah AH, Ahmed S, Rahman M. (2003) "Vertical transmission of dengue: first case report from Bangladesh" *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* Dec;34(4):800-3.
- 33 Tan PC, Rajasingam G, Devi S, Omar SZ.(2008) "Dengue infection in pregnancy: prevalence, vertical transmission, and pregnancy outcome". *Obstet Gynecol.* 111(5):1111-7.
- 34 Chambers TJ, Monath TP, "Advances in Virus Research, vol, 61. The Flaviviruses: Detection, Diagnosis and Vaccine Development". Elsevier Academic Press, 2003. pp. 235-267.
- 35 Ross TM (2010) "Dengue virus". *Clin Lab Med.,* 30(1):149-60.
- 36 Buhl, MR (2005). "Flavivirus infections: yellow fever, dengue fever and Japanese encephalitis." *Ugeskr Laeger* 167(43): 4076-4080.
- 37 Holmes EC (2006). "The evolutionary biology of dengue virus." *Novartis Found Symp* 277: 177-187; discussion 187-192, 251-173.
- 38 Clyde K, Kyle JL, Harris E. (2006) "Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis" *J. Virol.,* 80 (23), 11418-11431
- 39 Tomlinson SM, Malmstrom RD, Watowich SJ. "New approaches to structure-based discovery of dengue protease inhibitors". *Infect Disord Drug Targets.* 2009 Jun;9(3):327-43.
- 40 del Angel RM, Reyes-del Valle J. (2013) "Dengue vaccines: strongly sought but not a reality just yet". *PLoS Pathog.* 9(10):e1003551.
- 41 Lindenbach BD, Rice CM (2003). "Molecular biology of flaviviruses." *Adv Virus Res.* 59: 23-61.
- 42 Teoh PG, Ooi AS, et al. (2009). "Virus-specific read-through codon preference affects infectivity of chimeric cucumber green mottle mosaic viruses displaying a dengue virus epitope." *J Biomed Biotechnol* 2009: 781712.



- 43 van der Schaar HM, Rust MJ, Chen C, van der Ende-Metselaar H, Wilschut J, Zhuang X, Smit JM. (2008) "Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells". *PLoS Pathog.* Dec;4(12):e1000244.
- 44 Fields virology, 5th ed., vol. 1. Lippincott William & Wilkins, Philadelphia, PA. p. 1101–1152.
- 45 Weaver SC, Vasilakis N. (2009) "Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease". *Infect Genet Evol.* Jul;9(4):523-40
- 46 Silva BM, Sousa LP, Gomes-Ruiz AC, Leite FG, Teixeira MM, da Fonseca FG, Pimenta PF, Ferreira PC, Kroon EG, Bonjardim CA. (2011) "The dengue virus nonstructural protein 1 (NS1) increases NF- κ B transcriptional activity in HepG2 cells". *Arch Virol.* Jul;156(7):1275-9. Epub 2011 Mar 22
- 47 Lindenbach BD, Rice CM. (1997). "Trans-complementation of yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication". *J. Virol.* 71:9608–9617.
- 48 Lindenbach BD, Rice CM (1999). "Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function". *J. Virol.* 73:4611–4621.
- 49 Chen Y, Ren RW, Liu JW. (2014) "Research progress in the structure and function of dengue virus non-structural 1 protein". *Bing Du Xue Bao.* Nov;30(6):683-8.
- 50 Falgout B, Miller RH, Lai CJ. (1993) "Deletion analysis of dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: identification of a domain required for NS2B-NS3 protease activity". *J. Virol.* 67:2034–2042.
- 51 Chambers TJ, Grakoui A, Rice CM. (1991) "Processing of the yellow fever virus nonstructural polyprotein: a catalytically active NS3 proteinase domain and NS2B are required for cleavages at dibasic sites". *J. Virol.* 65: 6042–6050.
- 52 Miller S, Kastner S, Krijnse-Locker J, Buhler S, Bartenschlager S. (2007) "The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner". *J. Biol. Chem.* 282:8873–8882.
- 53 Xie X, Wang QY, Xu HY, Qing M, Kramer L, Yuan Z, Shi PY. (2011) "Inhibition of dengue virus by targeting viral NS4B protein." *J Virol.* Nov;85(21):11183-95. Epub 2011 Aug 24.
- 54 Miller S, Sparacio S, Bartenschlager S. (2006) "Subcellular localization and membrane topology of the dengue virus type 2 non-structural protein 4B". *J. Biol. Chem.* 281:8854–8863.
- 55 Tan BH et al. (1996). "Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity". *Virology* 216:317–325.
- 56 Ackermann M, Padmanabhan R. (2001) "De novo synthesis of RNA by the dengue virus RNA- dependent RNA polymerase exhibits temperature dependence at the initiation but not elongation phase". *J. Biol. Chem.* 276: 39926–39937.
- 57 Halstead SB, Heinz FX, Barrett AD, Roehrig JT. (2005) "Dengue virus: molecular basis of cell entry and pathogenesis". *Vaccine.* Jan 4;23(7):849-56.
- 58 Acosta EG, Castilla V, et al. (2008). "Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis." *J Gen Virol* 89(Pt 2): 474-484
- 59 Garcia-Montalvo BM, Medina F, et al. (2004). "La protein binds to NS5 and NS3 and to the 5' and 3' ends of Dengue 4 virus RNA." *Virus Res* 102(2): 141-150
- 60 Qin CF, Jiang T, et al. (2005). "Capsid-targeted viral inactivation for dengue virus infection." *Wei Sheng Wu Xue Bao* 45(1): 111-115.
- 61 del Angel RM (2006). "Entrada del virus del dengue: Moléculas que pueden modular la patogenia viral." *Cinvestav revista* Julio-Septiembre 2006: 38-43.
- 62 Jain SK, Jain, S. (2005). "Molecular mechanism of dengue virus: entry and fusion with target cell". *Indian journal of clinical biochemistry.* 20(2), 92-103
- 63 Holmes EC (2009) "RNA virus genomics: A world of possibilities". *J Clin Invest.*;119(9):2488–2495



- 64 Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva : World Health Organization.
<http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/print.html>
- 65 Holmes C (2009). "The evolution and emergence of RNA viruses. Oxford Series in Ecology and Evolution". P.H. Harvey, and R.M. May, editors. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom.
- 66 Kalayanaroj S. et.al. (1997) "Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness". *Journal of Infectious Diseases* , 176:313–321.
- 67 Srikiatkachorn A. et al. (2007) "Natural history of plasma leakage in dengue hemorrhagic fever: a serial ultrasonic study". *Pediatric Infectious Disease Journal*, 26(4):283–290.
- 68 Khilnani P. (2011) "The need for more evidence in the treatment of dengue hemorrhagic fever and shock syndromes". *Pediatr Crit Care Med*. Jan;12(1):116-7.
- 69 Nimmanitya S, et al. (1969) "Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962–64. Observations on hospitalized patients with haemorrhagic fever". *Am.J.Trop.Hyg.* , 18(6):954-971.
- 70 Martinez-Torres E, Polanco-Anaya AC, Pleites-Sandoval EB. (2008) "Why and how children with dengue die? ". *Revista cubana de medicina tropical*, 60(1):40–47.
- 71 Nimmanitya S. (1987) "Clinical spectrum and management of dengue haemorrhagic fever". *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 18(3):392–397.
- 72 Gubler DJ, Kuno G, eds. (1997) "Dengue and dengue hemorrhagic fever". New York, CAB International, 313–333.
- 73 Shu PY, Huang JH. "Current advances in dengue diagnosis". *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2004, 11(4):642–650.
- 74 Lanciotti RS. (2003) "Molecular amplification assays for the detection of flaviviruses". *Adv Virus Res*. 61:67-99. Review.
- 75 Lanciotti RS et. al. (1992) "Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction". *Journal of Clinical Microbiology*, 30:545–551.
- 76 Harris E et al. (1998) "Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single tube multiplex reverse transcriptase PCR". *Journal of Clinical Microbiology*, 36:2634–2639.
- 77 Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. (2005) "Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay". *J Clin Microbiol*. Oct;43(10):4977-83.
- 78 Chien LJ, Liao TL, Shu PY, Huang JH, Gubler DJ, Chang GJ. (2006) "Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses". *J Clin Microbiol*. Apr;44(4):1295-304.
- 79 Singh MP, Goyal K, Ratho RK. (2010) "Nonstructural protein NS1: giving a new structure to dengue diagnosis". *J Clin Microbiol*. Dec;48(12):4688
- 80 Singh MP, Majumdar M, Singh G, Goyal K, Preet K, Sarwal A, Mishra B, Ratho RK. (2010) "NS1 antigen as an early diagnostic marker in dengue: report from India". *Diagn Microbiol Infect Dis*. Sep;68(1):50-4.
- 81 Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, Chin C, Lin TH, Huang JH. (2003) "Comparison of capture immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and nonstructural protein NS1 serotype-specific IgG ELISA for differentiation of primary and secondary dengue virus infections". *Clin Diagn Lab Immunol*. Jul;10(4):622-30.
- 82 Vazquez S et al. (2005) "Serological markers during dengue 3 primary and secondary Infections". *Journal of Clinical Virology*, 33(2):132–137.
- 83 Fernandez RJ, Vazquez S. (1990) "Serological diagnosis of dengue by an ELISA inhibition method (EIM)". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85(3):347 351.



- 84 Chanama S et al. (2004) "Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections: levels and positive rates in comparison with primary infections". *Journal of Clinical Virology*, 31:185–189.
- 85 Falconar AK, de Plata E, Romero-Vivas CM. (2006) "Altered enzyme-linked immunosorbent assay immunoglobulin M (IgM)/IgG optical density ratios can correctly classify all primary or secondary dengue virus infections 1 day after the onset of symptoms, when all of the viruses can be isolated". *Clinical and Vaccine Immunology*, 13:1044–1051.
- 86 Teles FS. (2011) "Biosensors and rapid diagnostic tests on the frontier between analytical and clinical chemistry for biomolecular diagnosis of dengue disease: A review". *Anal Chim Acta*. Feb 14;687(1):28-42. Epub 2010 Dec 15.
- 87 Huhtamo E, Hasu E, Uzcátegui NY, Erra E, Nikkari S, Kantele A, Vapalahti O, Piiparinen H. (2010) "Early diagnosis of dengue in travelers: comparison of a novel real-time RT-PCR, NS1 antigen detection and serology". *J Clin Virol*. Jan;47(1):49-53. Epub 2009 Dec 5.
- 88 Kuno G, Gomez I, Gubler DJ. (1991) "An ELISA procedure for the diagnosis of dengue Infections". *Journal of Virological Methods*, 33:101–113.
- 89 Dung NM, Day NP, Tam DT. (1999) "Fluid replacement in dengue shock syndrome: a randomized, double-blind comparison of four intravenous-fluid regimens". *Clinical Infectious Diseases*, 29:787–794.
- 90 Ngo NT, Cao XT, Kneen R. (2001) "Acute management of dengue shock syndrome: a randomized double-blind comparison of 4 intravenous fluid regimens in the first hour". *Clinical Infectious Diseases*, 32:204–213.
- 91 Wills BA et al. (2005) "Comparison of three fluid solutions for resuscitation in dengue shock syndrome". *New England Journal of Medicine*, 353:877–889.
- 92 Dengue. Sitio web de la Secretaría de Salud del Estado de Nuevo León. México. http://www.nl.gob.mx/?P=salud_familia_enf_dengue
- 93 Thomas SJ, Rothman AL. (2015) "Trials and tribulations on the path to developing a dengue vaccine". doi: 10.1016/j.vaccine.2015.05.095. [Epub ahead of print]
- 94 Flipse J, Smit JM. (2015) The Complexity of a Dengue Vaccine: A Review of the Human Antibody Response. *PLoS Negl Trop Dis*. Jun 11;9(6):e0003749. doi: 10.1371/journal.pntd.0003749. eCollection 2015 Jun. Review.
- 95 Dengue Vaccine Initiative. (2015) <http://www.denguevaccines.org/vaccine-development>
- 96 Wilder-Smith A, Ooi EE, Vasudevan SG, Gubler DJ. (2010) "Update on dengue: epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development". *Curr Infect Dis Rep*. 2010 May;12(3):157-64.
- 97 Guy B, Barrere B, Malinowski C, Saville M, Teyssou R, Lang J (2011) "From research to phase III: preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine" *Vaccine*, 29, pp. 7229–7241.
- 98 Schwartz LM, Halloran ME, Durbin AP, Longini IM Jr. (2015) "The dengue vaccine pipeline: Implications for the future of dengue control". *Vaccine*. 2015 Jun 26;33(29):3293-8
- 99 Durbin AP, McArthur J, Marron JA, Blaney JE, Thumar B, Wanionek K, et al. (2006) "The live attenuated dengue serotype 1 vaccine rDEN1Delta30 is safe and highly immunogenic in healthy adult volunteers" *Hum Vaccine*, 2, pp. 167–173
- 100 Durbin A, Karron RA, Sun W, Vaughn DW, Reynolds MJ, Perreault JR, et al. (2001) "Attenuation and immunogenicity in humans of a live dengue virus type-4 vaccine candidate with a 30 nucleotide deletion in its 3'-untranslated region" *Am J Trop Med Hyg*, 65, pp. 405–413
- 101 Osorio JE, Huang CYH, Kinney RM, Stinchcomb DT (2011) Development of DENVax: a chimeric dengue-2 PDK-53-based tetravalent vaccine for protection against dengue fever. *Vaccine*, 29 (2011), pp. 7251–7260



- 102 Osorio JE, Velez ID, Thomson C, Lopez L, Jimenez A, Haller AA, et al. (2014) "Safety and immunogenicity of a recombinant live attenuated tetravalent dengue vaccine (DENVax) in flavivirus -naïve healthy adults in Colombia: a randomised, placebo-controlled, phase 1 study" *Lancet Infect Dis*, 14, pp. 830–838.
- 103 Collier BAG, Clements DE, Bett AJ, Sagar SL, Ter Meulen JH (2011) "The development of recombinant subunit envelope-based vaccines to protect against dengue virus induced disease" *Vaccine*, 29, pp. 7267–7275
- 104 ClinicalTrials.gov
Study of a dengue vaccine (V180) in healthy adults (V180-001)
(2015) (<http://clinicaltrials.gov/show/NCT0147758>) (accessed April 5, 2015)
- 105 Clinical Trials.gov
Safety study of a vaccine (DENV-1 PIV) to prevent dengue disease
(2015) (<http://clinicaltrials.gov/show/NCT01502735>) (accessed April 5, 2015)
- 106 ClinicalTrials.gov
A two-dose primary vaccination study of a tetravalent dengue virus purified inactivated vaccine vs placebo in healthy adults (in Puerto Rico)
(2014) (<http://clinicaltrials.gov/show/NCT01702857>) (accessed April 5, 2015)
- 107 OMS Dengue y dengue grave Nota descriptiva N° 117
Mayo de 2015 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>
- 108 Andoh T (1998). "Effect of bafilomycin A1 on the growth of Japanese encephalitis virus in Vero Cells." *J. Neurovirol.* 4: 627-631.
- 109 Chapel C (2006). "Antiviral effect of a-glucosidase inhibitors on viral morphogenesis and binding properties of hepatitis C-like virus-like particles." *J. Gen. Virol.* 87: 861-871.
- 110 Yin Z, Chen YL, et al. (2009). "An adenosine nucleoside inhibitor of dengue virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(48): 20435-20439.
- 111 Singhi S, Kissoon N, et al. (2007). "Dengue and dengue hemorrhagic fever: management issues in an intensive care unit." *J Pediatr (Rio J)* 83(2 Suppl): S22-35.
- 112 Ahluwalia G, Sharma SK (2004). "Dengue: current trends and challenges--an Indian perspective." *J Assoc Physicians India* 52: 561-563.
- 113 Bartenschlager R, Miller S (2008). "Molecular aspects of Dengue virus replication." *Future Microbiol* 3: 155-165.
- 114 Blaney JE Jr, Durbin AP, Murphy BR, Whitehead SS. (2006) "Development of a live attenuated dengue virus vaccine using reverse genetics". *Viral Immunol.* Spring;19(1):10-32.
- 115 Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. (2007) "Prospects for a dengue virus vaccine". *Nat Rev Microbiol.* Jul;5(7):518-28.
- 116 Kinney RM, Huang CY.(2001) "Development of new vaccines against dengue fever and Japanese encephalitis". *Intervirology*, 44(2-3):176-97.
- 117 Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG et al. (2012) "Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus". *PLoS Negl Trop Dis*;6:e1760. doi:10.1371/journal.pntd.0001760.
- 118 Rodriguez Rodriguez DR, Garza Rodriguez ML et al. (2009). "Dengue virus antibodies in blood donors from an endemic area." *Transfus Med* 19(3): 125-131.
- 119 Garza Rodriguez ML, Rodriguez Rodriguez DR et al. (2010). "Serologic Surveillance for West Nile Virus and Other Flaviviruses in Febrile Patients, Encephalitic Patients, and Asymptomatic Blood Donors in Northern Mexico." *Vector Borne Zoonotic Dis.* Mar;10(2):151-7.
- 120 Lorono-Pino MA, Farfan-Ale JA, et al. (2004). "Introduction of the American/Asian genotype of dengue 2 virus into the Yucatan State of Mexico". *Am J Trop Med Hyg* 71(4): 485-492.
- 121 Cuddehe, M. (2009). "Mexico fights rise in dengue fever." *Lancet* 374(9690): 602
- 122 Tapia-Conyer R, Mendez-Galvan JF, et al. (2009). "The growing burden of dengue in Latin America." *J Clin Virol* 46 Suppl 2: S3-6.
- 123 Whitehorn, J., Simmons, C.P. (2011) "The pathogenesis of Dengue" *Vaccine*. 29:7221-7228.



- 124 Yacoub S, Wills B. (2014) "Predicting outcome from dengue". *BMC Med.* Sep 4;12:147
- 125 Martina BE. (2014) "Dengue pathogenesis: a disease driven by the host response". *Sci Prog.*;97(Pt 3):197-214. Review.
- 126 Diamond MS1, Roberts TG, Edgil D, Lu B, Ernst J, Harris E. (2000) „Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons". *J Virol.* Jun;74(11):4957-66.
- 127 Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, Bozza PT, Kubelka CF. (2008) "Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity". *BMC Infect Dis.* Jun 25;8:86.
- 128 De Andrea M, Gariglio M, Gioia D, Landolfo S, Ravera R (2002). "The interferon system: an overview". *Eur J Paediatr Neurol* (6): A41–58.
- 129 Nagano Y, Kojima Y (1954). "Pouvoir immunisant du virus vaccinal inactivé par des rayons ultraviolets". *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* (in French) 148 (19–20)
- 130 Isaacs A, Lindenmann J (1957). "Virus interference. I. The interferon". *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 147 (927): 258–67.
- 131 De Weerd NA, Samarajiwa SA, Hertzog PJ (2007). "Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions". *J Biol Chem* 282 (28): 20053–20057.
- 132 Cohen, B; Parkin, J (2001). "An overview of the immune system". *Lancet* 357 (9270): 1777–89
- 133 Hermant P, Michiels T. (2014) "Interferon-λ in the Context of Viral Infections: Production, Response and Therapeutic Implications". *J Innate Immun*;6(5):563-74.
- 134 Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. (2004) "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions". *J Leukoc Biol.* Feb;75(2):163-89. Epub 2003 Oct 2.
- 135 Fensterl V, Sen GC (2009). "Interferons and viral infections". *BioFactors* 35 (1): 14–20.
- 136 Plataniias LC (2005). "Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling". *Nature reviews. Immunology* 5 (5): 375–386
- 137 Takaoka A, Hayakawa S, Yanai H, Stoiber D, Negishi H, Kikuchi H, Sasaki S, Imai K, Shibue T, Honda K, Taniguchi T (2003). "Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence" (PDF). *Nature* 424 (6948): 516–23.
- 138 Assil S, Webster B, Dreux M. (2003) "Regulation of the Host Antiviral State by Intercellular Communications". *Viruses.* Aug 19;7(8):4707-33. doi: 10.3390/v7082840
- 139 Samuel CE (2001) "Antiviral actions of interferons". *Clin Microbiol Rev.* Oct;14(4):778-809
- 140 Weber F (2007) "Interaction of hepatitis C virus with the type I interferon system". *World J Gastroenterol.* Sep 28;13(36):4818-23.
- 141 Schoggins JW, Rice CM. (2011) "Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions". *Curr Opin Virol.* Dec;1(6):519-25. doi: 10.1016/j.coviro.2011.10.008.
- 142 Kristiansen H, Gad HH, Eskildsen-Larsen S, Despres P, Hartmann R. (2011) "The oligoadenylate synthetase family, an ancient protein family with multiple antiviral activities". *J Interferon Cytokine Res.* 31:41–47.
- 143 Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, Rice CM. (2011) "A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response". *Nature.* 472:481–485.
- 144 Toth AM, Zhang P, Das S, George CX, Samuel CE. (2006) "Interferon action and the double-stranded RNA-dependent enzymes ADAR1 adenosine deaminase and PKR protein kinase". *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2006;81:369–434.
- 145 Perez-Caballero D, Zang T, Ebrahimi A, McNatt MW, Gregory DA, Johnson MC, Bieniasz PD. (2009) "Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells". *Cell.* 139:499–511.
- 146 Weidner JM, Jiang D, Pan XB, Chang J, Block TM, Guo JT. (2010) "Interferon-induced cell membrane proteins, IFITM3 and tetherin, inhibit vesicular stomatitis virus infection via distinct mechanisms". *J Virol.* 84:12646–12657.



- 147 Onoguchi K, Yoneyama M, Fujita T. (2011) "Retinoic acid-inducible gene-I-like receptors". *J Interferon Cytokine Res.* 31:27–31.
- 148 Pine R (1992) "Constitutive expression of an ISGF2/IRF1 transgene leads to interferon-independent activation of interferon-inducible genes and resistance to virus infection". *J Virol.* 66:4470–4478.
- 149 Kimura T, Nakayama K, Penninger J, Kitagawa M, Harada H, Matsuyama T, Tanaka N, Kamijo R, Vilcek J, Mak TW, et al. (1994) "Involvement of the IRF-1 transcription factor in antiviral responses to interferons". *Science.* 264:1921–1924.
- 150 Daffis S, Samuel MA, Suthar MS, Keller BC, Gale M, Jr, Diamond MS. (2008) "Interferon regulatory factor IRF-7 induces the antiviral alpha interferon response and protects against lethal West Nile virus infection". *J Virol.* 82:8465–8475.
- 151 Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, Shimada N, Ohba Y, Takaoka A, Yoshida N, et al. (2005) "IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses". *Nature.* 434:772–777.
- 152 Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, et al. (2006) "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses". *Nature.* 441:101–105.
- 153 Huang IC, Bailey CC, Weyer JL, Radoshitzky SR, Becker MM, Chiang JJ, Brass AL, Ahmed AA, Chi X, Dong L, et al. (2011) "Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus". *PLoS Pathog.* 7:e1001258.
- 154 Wang X, Hinson ER, Cresswell P. (2007) "The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts". *Cell Host Microbe.* 2:96–105.
- 155 Seo JY, Yaneva R, Hinson ER, Cresswell P. (2011) "Human cytomegalovirus directly induces the antiviral protein viperin to enhance infectivity". *Science.* 332:1093–1097.
- 156 Espert L, Degols G, Gongora C, Blondel D, Williams BR, Silverman RH, Mechti N. (2003) "ISG20, a new interferon-induced RNase specific for single-stranded RNA, defines an alternative antiviral pathway against RNA genomic viruses". *J Biol Chem.* 278:16151–16158.
- 157 Umareddy, I. Towards understanding of the replication and pathogenesis of dengue infection. (2007) PhD Thesis, University of Basel, Faculty of Science. pp 69-70. (<http://edoc.unibas.ch/827/>)
- 158 Best SM, Morris KL, Shannon JG, Robertson SJ, Mitzel DN, Park GS, Boer E, Wolfenbarger JB, Bloom ME (2005) "Inhibition of interferon-stimulated JAK-STAT signaling by a tick-borne flavivirus and identification of NS5 as an interferon antagonist". *J Virol.* 79, 12828-39.
- 159 Garcia-Sastre A. (2004) "Identification and characterization of viral antagonists of type I interferon in negative-strand RNA viruses". *Curr Top Microbiol Immunol* 283, 249-80.
- 160 Levy DE, Garcia-Sastre A. (2001) "The virus battles: IFN induction of the antiviral state and mechanisms of viral evasion". *Cytokine Growth Factor Rev* 12, 143-56.
- 161 Lin RJ, Chang BL, Yu HP, Liao C, Lin YL (2006) "Blocking of interferon-induced JakStat signaling by Japanese encephalitis virus NS5 through a protein tyrosine phosphatase mediated mechanism". *J Virol* 80, 5908-18.
- 162 Munoz-Jordan JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, Martinez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI, Garcia-Sastre A. (2005). "Inhibition of Alpha/Beta Interferon Signaling by the NS4B Protein of Flaviviruses". *J Virol* 79, 8004-13.
- 163 Sen GC (2001). "Viruses and interferons". *Annu Rev Microbiol* 55, 255-81.
- 164 Muñoz-Jordán JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, Martínez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI, García-Sastre A.J (2005) "Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses". *J Virol.* Jul;79(13):8004-13.
- 165 Muñoz-Jordán JL, Laurent-Rolle M, Ashour J, Martínez-Sobrido L, Ashok M, Lipkin WI, García-Sastre A. (2005) "Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses". *J Virol.* Jul;79(13):8004-13.



- 166 Rodriguez-Madoz JR, Bernal-Rubio D, Kaminski D, Boyd K, Fernandez-Sesma A. (2010) "Dengue virus inhibits the production of type I interferon in primary human dendritic cells". *J Virol*. May;84(9):4845-50. Epub 2010 Feb 17.
- 167 Fischl W, Bartenschlager R. (2011) "Exploitation of cellular pathways by Dengue virus". *R. Curr.Op. Microbiol*. 14:470-475
- 168 Munoz-Jordan JL, Sanchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, Garcia- Sastre A. (2003) "Inhibition of interferon signaling by dengue virus". *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:14333-14338.
- 169 Ho LJ, Hung LF, Weng CY, Wu WL, Chou P, Lin YL, Chang DM, Tai TY, Lai JH (2005) "Dengue virus type 2 antagonizes IFN-alpha but not IFN-gamma antiviral effect via down-regulating Tyk2- STAT signaling in the human dendritic cell". *J Immunol*, 174:8163-8172.
- 170 Mazzon M, Jones M, Davidson A, Chain B, Jacobs M. (2009) "Dengue virus NS5 inhibits interferon-alpha signaling by blocking signal transducer and activator of transcription 2 phosphorylation". *J Infect Dis*, 200:1261-1270.
- 171 Ashour J, Laurent-Rolle M, Shi PY, Garcia-Sastre A. (2009) "NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation". *J Virol*, 83:5408-5418.
- 172 Rodriguez-Madoz JR, Belicha-Villanueva A, Bernal-Rubio D, Ashour J, Ayllon J, Fernandez-Sesma A. (2010) "Inhibition of the type I interferon response in human dendritic cells by dengue virus infection requires a catalytically active NS2B3 complex". *J Virol*. Oct;84(19):9760-74. doi: 10.1128/JVI.01051-10. Epub 2010 Jul 21.
- 173 Umareddy I, Pluquet O, Wang QY, Vasudevan SG, Chevet E, Gu F (2007). "Dengue virus serotype infection specifies the activation of the unfolded protein response" *J.Gen.Virol*. Sep 24; 4:91.
- 174 Umareddy I, Tang KF, Vasudevan SG, Devi S, Hibberd ML, Gu F. (2008) "Dengue virus regulates type I interferon signalling in a strain-dependent manner in human cell lines". *J Gen Virol*. Dec;89(Pt 12):3052-62. doi: 10.1099/vir.0.2008/001594-0.
- 175 Takhampunya R, Palmer DR, McClain S, Barvir DA, Lynch J, Jarman RG, Thomas S, Gibbons RV, Burgess TH, Sun P, Kamau E, Putnak R, Zhang C. (2009) "Phenotypic analysis of dengue virus isolates associated with dengue fever and dengue hemorrhagic fever for cellular attachment, replication and interferon signaling ability". *Virus Res*. Oct;145(1):31-8. doi: 10.1016/j.virusres.2009.05.016.
- 176 Yeo AS, Azhar NA, Yeow W, Talbot CC Jr, Khan MA, Shankar EM, Rathakrishnan A, Azizan A, Wang SM, Lee SK, Fong MY, Manikam R, Devi Sekaran S. (2014) "Lack of clinical manifestations in asymptomatic dengue infection is attributed to broad down-regulation and selective up-regulation of host defence response genes". *PLoS One*. Apr 11;9(4):e92240.
- 177 Mathew A, Rothman AL (2008) "Understanding the contribution of cellular immunity to dengue disease pathogenesis". *Immunological reviews* 225: 300-313
- 178 Igarashi A. (1978) "Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses". *J Gen Virol*. Sep;40(3):531-44.
- 179 Singh KR, Pavri KM. (1967) "Experimental studies with chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*". *Acta Virol*. Nov;11(6):517-26.
- 180 Kuno G, Gubler DJ, Vélez M, Oliver A. (1985) "Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses". *Bull World Health Organ*. 63(2):279-86.
- 181 Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J. (1963) "Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium." *Cancer Res*. Sep;42(9):3858-63.
- 182 Japan Cell Bank: Huh-7 cell line data.
<http://cellbank.nibio.go.jp/celldata/jcrb0403.htm>
- 183 Capstick PB. (1963) "Growth of baby hamster kidney cells in suspension" *Proc R Soc Med*. Dec;56:1062-4
- 184 Hernandez R, Brown DT. (2010) "Growth and maintenance of baby hamster kidney (BHK) cells". *Curr Protoc Microbiol*. May;Chapter 4:Appendix 4H



- 185 NORMA Oficial Mexicana NOM-032-SSA2-2002, Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector.
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/032ssa202.html>
- 186 Galan Huerta KA. (2013) "Identificación y análisis de las variantes genómicas del virus del dengue y su asociación con la presentación clínica en una zona de baja y otra de alta endemicidad en México". Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- 187 Salas-Benito J, Reyes-Del Valle J, Salas-Benito M, Ceballos-Olvera I, Mosso C, del Angel RM. (2007) "Evidence that the 45-kD glycoprotein, part of a putative dengue virus receptor complex in the mosquito cell line C6/36, is a heat-shock related protein." *Am J Trop Med Hyg.* 77(2):283-90.
- 188 Gould EA, Clegg JCS. (1991). "Growth, titration and purification of alphaviruses and flaviviruses", p. 43–78. In B. W. J. Mahy (ed.), *Virology: a practical approach*. IRL Press, Oxford, United Kingdom.
- 189 "Retorno del dengue a las Américas, llamada de alerta a los sistemas de vigilancia. Washington, DC, 21 de febrero de 2002 (OPS)"
<http://www.paho.org/Spanish/DPI/100/100feature08.htm>
- 190 Torres Galicia I, Cortés Poza D, Becker I. (2014) "Dengue en México: análisis de dos décadas" *Gaceta Médica de México.* 150:122-7
- 191 Leduc-Galindo D, Gloria-Herrera U, Ramos-Jiménez J, Garcia-Luna S, Arellanos-Soto D, Mendoza-Tavera N, Tavitas-Aguilar I, Garcia-Garcia E, Galindo-Galindo E, Villarreal-Perez J, Fernandez-Salas I, Santiago GA, Muñoz-Jordan J, Rivas-Estilla AM. (2015) "Characterization of the dengue outbreak in Nuevo Leon state, Mexico, 2010". *Infection.* Apr;43(2):201-6. doi: 10.1007/s15010-014-0700-7. Epub 2015 Jan 9
- 192 Sarti E, Cox H, Besada-Lombana S, Tapia-Maruri L. (2015) "Dengue Awareness in Latin American Populations: A Questionnaire Study". *Infect Dis Ther.* Jun;4(2):199-211.
- 193 Pozzetto B, Memmi M, Garraud O. (2015) "Is transfusion-transmitted dengue fever a potential public health threat?" *World J Virol.* May 12;4(2):113-23
- 194 Villordo SM, Filomatori CV, Sánchez-Vargas I, Blair CD, Gamarnik AV. (2015) "Dengue virus RNA structure specialization facilitates host adaptation". *PLoS Pathog.* Jan 30;11(1):e1004604.
- 195 Villordo SM, Gamarnik AV. (2013) "Differential RNA sequence requirement for dengue virus replication in mosquito and mammalian cells". *J Virol.* Aug;87(16):9365-72
- 196 Calvert JK, Helbig KJ, Dimasi D, Cockshell M, Beard MR, Pitson SM, Bonder CS, Carr JM. (2015) "Dengue Virus Infection of Primary Endothelial Cells Induces Innate Immune Responses, Changes in Endothelial Cells Function and Is Restricted by Interferon-Stimulated Responses". *J Interferon Cytokine Res.* Aug;35(8):654-65
- 197 Shresta S, Sharar KL, Prigozhin DM, Snider HM, Beatty PR, Harris E. (2005) "Critical roles for both STAT1-dependent and STAT1-independent pathways in the control of primary dengue virus infection in mice". *J Immunol.* Sep 15;175(6):3946-54.
- 198 Struyf S, Menten P, Lenaerts JP, Put W, D'Haese A, De Clercq E, Schols D, Proost P, Van Damme J. (2001) "Diverging binding capacities of natural LD78beta isoforms of macrophage inflammatory protein-1alpha to the CC chemokine receptors 1, 3 and 5 affect their anti-HIV-1 activity and chemotactic potencies for neutrophils and eosinophils". *Eur J Immunol.* Jul;31(7):2170-8.
- 199 Khunchai S, Junking M, Suttitheptumrong A, Kooptiwut S, Haegeman G, Limjindaporn T, Yenchitsomanus PT. (2015) "NF-κB is required for dengue virus NS5-induced RANTES expression". *Virus Res.* Feb 2;197:92-100
- 200 Torres S, Hernández JC, Giraldo D, Arboleda M, Rojas M, Smit JM, Urcuqui-Inchima S. (2013) "Differential expression of Toll-like receptors in dendritic cells of patients with dengue during early and late acute phases of the disease". *PLoS Negl Trop Dis.* 7(2):e2060
- 201 Balmaseda A, Hammond SN, et al. (2006). "Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue." *Am J Trop Med Hyg* 74(3): 449-456.

CAPÍTULO XI

ANEXOS



11.1. TABLA DE GENES EVALUADOS EN EL ARREGLO DE PCR PAHS-016ZA (QIAGEN)

Position	Unigene	Refseq	Symbol	Description
A01	Hs.12341	NM_001111	ADAR	Adenosine deaminase, RNA-specific
A02	Hs.523309	NM_004281	BAG3	BCL2-associated athanogene 3
A03	Hs.118110	NM_004335	BST2	Bone marrow stromal cell antigen 2
A04	Hs.2490	NM_033292	CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)
A05	Hs.74034	NM_001753	CAV1	Caveolin 1, caveolae protein, 22kDa
A06	Hs.303649	NM_002982	CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2
A07	Hs.514821	NM_002985	CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5
A08	Hs.715224	NM_001252	CD70	CD70 molecule
A09	Hs.838	NM_005191	CD80	CD80 molecule
A10	Hs.171182	NM_006889	CD86	CD86 molecule
A11	Hs.238990	NM_004064	CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)
A12	Hs.701991	NM_000246	CIITA	Class II, major histocompatibility complex, transactivator
B01	Hs.76452	NM_000567	CRP	C-reactive protein, pentraxin-related
B02	Hs.632586	NM_001565	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
B03	Hs.190622	NM_014314	DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58
B04	Hs.131431	NM_002759	EIF2AK2	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2
B05	Hs.62661	NM_002053	GBP1	Guanylate binding protein 1, interferon-inducible
B06	Hs.713441	NM_002116	HLA-A	Major histocompatibility complex, class I, A
B07	Hs.77961	NM_005514	HLA-B	Major histocompatibility complex, class I, B
B08	Hs.650174	NM_005516	HLA-E	Major histocompatibility complex, class I, E
B09	Hs.512152	NM_002127	HLA-G	Major histocompatibility complex, class I, G
B10	Hs.380250	NM_005531	IFI16	Interferon, gamma-inducible protein 16
B11	Hs.532634	NM_005532	IFI27	Interferon, alpha-inducible protein 27
B12	Hs.14623	NM_006332	IFI30	Interferon, gamma-inducible protein 30
C01	Hs.523847	NM_002038	IFI6	Interferon, alpha-inducible protein 6
C02	Hs.163173	NM_022168	IFIH1	Interferon induced with helicase C domain 1
C03	Hs.20315	NM_001548	IFIT1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1
C04	Hs.437609	NM_001547	IFIT2	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2
C05	Hs.744072	NM_001549	IFIT3	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
C06	Hs.458414	NM_003641	IFITM1	Interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)
C07	Hs.709321	NM_006435	IFITM2	Interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)
C08	Hs.374650	NM_021034	IFITM3	Interferon induced transmembrane protein 3
C09	Hs.37026	NM_024013	IFNA1	Interferon, alpha 1
C10	Hs.211575	NM_000605	IFNA2	Interferon, alpha 2
C11	Hs.1510	NM_021068	IFNA4	Interferon, alpha 4
C12	Hs.529400	NM_000629	IFNAR1	Interferon (alpha, beta and omega) receptor 1
D01	Hs.708195	NM_000874	IFNAR2	Interferon (alpha, beta and omega) receptor 2
D02	Hs.93177	NM_002176	IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast
D03	Hs.682604	NM_176891	IFNE	Interferon, epsilon
D04	Hs.73010	NM_002177	IFNW1	Interferon, omega 1
D05	Hs.193717	NM_000572	IL10	Interleukin 10



D06	Hs.602618	NM_000585	IL15	Interleukin 15
D07	Hs.654458	NM_000600	IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
D08	Hs.436061	NM_002198	IRF1	Interferon regulatory factor 1
D09	Hs.654566	NM_002199	IRF2	Interferon regulatory factor 2
D10	Hs.289052	NM_001571	IRF3	Interferon regulatory factor 3
D11	Hs.521181	NM_001098629	IRF5	Interferon regulatory factor 5
D12	Hs.166120	NM_001572	IRF7	Interferon regulatory factor 7
E01	Hs.1706	NM_006084	IRF9	Interferon regulatory factor 9
E02	Hs.458485	NM_005101	ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier
E03	Hs.459265	NM_002201	ISG20	Interferon stimulated exonuclease gene 20kDa
E04	Hs.207538	NM_002227	JAK1	Janus kinase 1
E05	Hs.656213	NM_004972	JAK2	Janus kinase 2
E06	Hs.80395	NM_002371	MAL	Mal, T-cell differentiation protein
E07	Hs.132966	NM_000245	MET	Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)
E08	Hs.153837	NM_002432	MNDA	Myeloid cell nuclear differentiation antigen
E09	Hs.517307	NM_002462	MX1	Myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)
E10	Hs.926	NM_002463	MX2	Myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)
E11	Hs.82116	NM_002468	MYD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)
E12	Hs.54483	NM_004688	NMI	N-myc (and STAT) interactor
F01	Hs.709191	NM_000625	NOS2	Nitric oxide synthase 2, inducible
F02	Hs.524760	NM_002534	OAS1	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa
F03	Hs.414332	NM_002535	OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa
F04	Hs.526464	NM_033238	PML	Promyelocytic leukemia
F05	Hs.496255	NM_002744	PRKCZ	Protein kinase C, zeta
F06	Hs.512410	NM_002818	PSME2	Proteasome (prosome, macropain) activator subunit 2 (PA28 beta)
F07	Hs.349094	NM_002351	SH2D1A	SH2 domain containing 1A
F08	Hs.521482	NM_003028	SHB	Src homology 2 domain containing adaptor protein B
F09	Hs.50640	NM_003745	SOCS1	Suppressor of cytokine signaling 1
F10	Hs.743244	NM_007315	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
F11	Hs.530595	NM_005419	STAT2	Signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa
F12	Hs.463059	NM_003150	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
G01	Hs.352018	NM_000593	TAP1	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)
G02	Hs.29344	NM_182919	TICAM1	Toll-like receptor adaptor molecule 1
G03	Hs.522632	NM_003254	TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
G04	Hs.657724	NM_003265	TLR3	Toll-like receptor 3
G05	Hs.659215	NM_016562	TLR7	Toll-like receptor 7
G06	Hs.660543	NM_138636	TLR8	Toll-like receptor 8
G07	Hs.87968	NM_017442	TLR9	Toll-like receptor 9
G08	Hs.379754	NM_198282	TMEM173	Transmembrane protein 173
G09	Hs.478275	NM_003810	TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
G10	Hs.510528	NM_003300	TRAF3	TNF receptor-associated factor 3
G11	Hs.75516	NM_003331	TYK2	Tyrosine kinase 2
G12	Hs.73793	NM_003376	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A
H01	Hs.520640	NM_001101	ACTB	Actin, beta
H02	Hs.534255	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin
H03	Hs.544577	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	Hs.412707	NM_000194	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H05	Hs.546285	NM_001002	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
H06	N/A	SA_00105	HGDC	Human Genomic DNA Contamination
H07	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H08	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H09	N/A	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H10	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H11	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H12	N/A	SA_00103	PPC	Positive PCR Control



11.2. DISEÑO DEL ARREGLO DE qPCR QIAGEN PAHS-016ZA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ADAR	BAG3	BST2	CASP1	CAV1	CCL2	CCL5	CD70	CD80	CD86	CDKN1B	CITTA
B	CRP	CXCL10	DDX58	EIF2AK2	GBP1	HLA-A	HLA-B	HLA-E	HLA-G	IFI16	IFI27	IFI30
C	IFI6	IFIH1	IFIT1	IFIT2	IFIT3	IFITM1	IFITM2	IFITM3	IFNA1	IFNA2	IFNA4	IFNAR1
D	IFNAR2	IFNB1	IFNE	IFNW1	IL10	IL15	IL6	IRF1	IRF2	IRF3	IRF5	IRF7
E	IRF9	ISG15	ISG20	JAK1	JAK2	MAL	MET	MNDA	MX1	MX2	MYD88	NMI
F	NOS2	OAS1	OAS2	PML	PRKCZ	PSME2	SH2D1A	SHB	SOC31	STAT1	STAT2	STAT3
G	TAP1	TICAM1	TIMP1	TLR3	TLR7	TLR8	TLR9	TMEM173	TNFSF10	TIRAF3	TYK2	VEGFA
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	HGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC



11.3. TÉCNICAS Y PROTOCOLOS

- CULTIVO CELULAR -

1. SUPLEMENTO DE MEDIOS DE CULTIVO

Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 10 mL. Marca Corning. Cat. 4488.

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Mechero de Bunsen.
- Pipetor.

I. Medio Leibovitz (L-15).

Reactivos

- Medio de cultivo Leibovitz (L-15) con *L*-Glutamina. 500 mL. In vitro S.A. cat. ME-040.
- Suero Bovino Fetal. 500 mL. HyClone. Cat. sh30396.03.
- Solución de antibiótico-antimicótico (100X) Penicilina-Estreptomicina-Anfotericina B, 100 mL, In vitro, S.A. Cat. A-07.
- Solución de aminoácidos no esenciales (100X), para medio mínimo esencial de Eagle, 100 mL, In vitro S.A. Cat. SR-05.
- Solución de bicarbonato de sodio al 7.5% esterilizado por membrana, 100 mL, In vitro S.A.



Protocolo

a) Medio al 10% SBF para mantenimiento de células C6/36.

Para suplementar 500 mL de medio L-15 al 10%, se requieren 50 mL de suero bovino fetal inactivado, 5.5 mL de solución antibiótico/antimicótico (100X) y 5.5 mL de solución de aminoácidos no esenciales (concentración final 1X). El medio al 10% es el que se debe utilizar para subcultivar.

b) Medio al 2% SBF para infección viral de células C6/36.

El medio de cultivo para infección viral debe estar al 2% con respecto al SBF. A 500 mL de medio L-15 se añaden 10 mL SBF + 5 mL de antibiótico/antimicótico + 5 mL de aminoácidos no esenciales.

Observaciones

- Es fundamental usar un suero bovino fetal compatible con las células C6/36 (HyClone), Gibco e Invitrogen parecen no dar buenos resultados, observándose como las células comienzan a decaer después del tercer pasaje.
- El volumen de bicarbonato necesario para alcalinizar el medio es empírico dependiendo del lote adquirido: el medio debe tornarse color rojo grosella para poder ser utilizado. En general para 500 mL de medio se añaden 3 mL de solución de bicarbonato y lograr un pH de 7.2.
- El medio de cultivo puede irse alcalinizando con el abrir y cerrar continuo de los frascos que lo contienen. Para acidificar el medio se pueden emplear unas gotas de HCl 1M esterilizado por filtración con una membrana de 0.22. Mantener el ácido y el bicarbonato en refrigeración a 4°C.



II. Medio Dulbecco's Modified Eagle Medium Advanced (Advanced-DMEM).

Reactivos

- Medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium Advanced (Advanced DMEM). 500 mL. GIBCO. Cat. 12491015.
- Suero Bovino Fetal. 500 mL. GIBCO. Cat. 16000-044.
- Solución de antibiótico penicilina/estreptomicina 100X. 100 mL. GIBCO. Cat. 15070-063.
- Amino ácidos no esenciales. 10 mM (100X). 100 mL. GIBCO. Cat. 11140-050.
- L-Glutamina. 200 mM (100X). 100 mL. GIBCO. Cat. 25030081.

Protocolo

a) Medio con 2% de SBF para mantenimiento de células Huh-7.

Para suplementar 500 mL de medio Advanced DMEM al 2% se requieren 10 mL de suero bovino fetal inactivado, 5 mL de amino ácidos no esenciales (100X), 5 mL de solución de antibiótico (100X penicilina/estreptomicina) y 5 mL de L- glutamina (100X).

b) Medio con 1% de SBF para infección viral de células Huh-7.

Para suplementar 500 mL de medio Advanced DMEM al 1% se requiere 1 mL de suero bovino fetal inactivado, 5 mL de amino ácidos no esenciales (100X), 5 mL de solución de antibiótico (100X penicilina/estreptomicina) y 5 mL de L- glutamina (100X).



III. Medio MEM para células BHK-21

Reactivos

- Medio de cultivo Minimum Essential Medium (MEM) en polvo. GIBCO. Cat. 41500-018.
- Bicarbonato de sodio grado reactivo. Sigma.
- Suero Bovino Fetal. 500 mL. GIBCO. Cat. 16000-044.
- Solución de antibiótico penicilina/estreptomicina 100X. 100 mL. GIBCO. Cat. 15070-063.
- L-Glutamina. 200 mM (100X). 100 mL. GIBCO. Cat. 25030081.

Protocolo

El medio se prepara de acuerdo a las especificaciones indicadas por Gibco, únicamente ajustando cantidades para el volumen deseado, en lugar de los 10L totales que rinde el frasco completo.

1. Medir 475 mL de agua miliQ estéril en una botella estéril de 500 mL.
2. Pesar 4.8 g de medio MEM en polvo, en una placa estéril de cultivo, adicionando el polvo dentro de la campana de cultivo celular y saliendo a pesar en la balanza granataria.
3. Añadir el medio en polvo al agua, a temperatura ambiente y después homogenizar suavemente la solución con agitación magnética. Lavar la placa con 5 mL de agua miliQ.
4. Pesar y adicionar de la misma forma 1.1 g de NaHCO_3 de la misma forma que se hizo con el medio en polvo. Lavar la placa también con 5 mL de agua miliQ.
5. Aforar el volumen a 500 mL.
6. La adición de estos reactivos debe dar un pH cercano a 7.8-7.9. Se puede medir el pH de una alícuota de medio para confirmar.



7. Esterilizar el volumen total de medio por filtración a través de una membrana de 0.22 μm . Posterior a la filtración, el pH aumenta entre 0.1 y 0.3 unidades. Esto es normal.
8. Suplementar el medio 1X con antibiótico/antimicótico penicilina-estreptomicina (5mL/100X/Gibco) y tomar alícuota de 5 mL para realizar prueba de esterilidad.
9. Si no hubo crecimiento a las 24 horas, suplementar al 7% con suero bovino fetal (35 mL) y alicuotar en volúmenes de 50 mL.



2. MANTENIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES.

Fundamento

El subcultivo provee la oportunidad para expandir la población celular total, aplicar presión selectiva empleando en el medio un agente de selección y permitir la generación de cultivos réplica para caracterización, experimentación, preservación y congelación. Cuando el cultivo se encuentra aproximadamente al 90% de confluencia, es necesario realizar su subcultivo para asegurar la formación de monocapas y evitar los cúmulos celulares. Los pasajes permiten mantener limpio el medio de cultivo y evitar la aglomeración de células, permitiendo que cada unidad de la monocapa reciba la misma concentración de nutrientes y se encuentre expuesta a las mismas condiciones que las demás células.

Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 10 mL. Marca Corning. Cat. 4488.
- Pipetas serológicas de 2 mL. Marca Fisherbrand. Cat. 13-678-11C.
- Botellas para cultivo celular de 25 cm².
 - c) Con filtro. Marca Corning. Cat. 430639.
 - d) Con tapa de rosca. Marca Corning. Cat. 430168.
- Botellas para cultivo celular de 75 cm².
 - c) Con filtro. Marca Corning. Cat. 430641.
 - d) Con tapa de rosca. Marca Corning. Cat. 430199.
- Raspadores celulares (gendarmes) de 25 cm. Marca Corning. Cat. 3010.
- Pipeta pasteur. Marca Corning. Cat. 101001440.

Reactivos

- Medio de cultivo



- a) Medio L-15 (Leibovitz). Marca In vitro SA, cat. ME-040. Suplementado al 5% con suero bovino fetal.
- b) Advanced DMEM. Marca GIBCO cat. 12491015. Suplementado al 2% con suero bovino fetal.
- c) Minimum Essential Medium w/L-Glut. Marca GIBCO cat. 41500-018 Suplementado al 7% con suero bovino fetal
- Solución buffer salino de fosfatos (PBS) 1X.
- Tripsina-EDTA 0.25% 500 mL. Marca GIBCO cat. 15050057.
- Aminoácidos no esenciales 100X. Marca GIBCO cat. 11140-050.
- L-glutamina 100X. Marca GIBCO cat. 25030081.
- Solución de bicarbonato de sodio al 7.5% esterilizado por membrana, 100 mL, In vitro S.A.

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Bomba de vacío.
- Centrífuga.
- Incubadora con tanque de CO₂.
- Incubadora sin tanque de CO₂.
- Bomba de presión y vacío.

I. Protocolo para células C6/36

1. Golpear botella confluyente para eliminar células C6/36 que no se encuentren adheridas. Si no se va a dividir el cultivo es innecesario golpear la botella.
2. Decantar medio de cultivo.
3. Añadir medio nuevo a la botella (L-15, 10% SBF. 25 cm²: 5 mL medio, 75 cm², 10 mL medio).
4. Golpear botella con medio nuevo. De ser necesario, realizar raspado con gendarme para desprender la mayoría de células. Hacer dilución



- 1:10 en botellas nuevas o dependiendo de la necesidad de botellas a sembrar.
5. Ajustar volumen final en las botellas subcultivadas (25 cm²: 5 mL medio, 75 cm², 10 mL medio).
 6. Al cultivo inicial añadir medio fresco y continuar creciendo.
 7. Crecer a temperatura ambiente (23-24°C) con la tapa cerrada.
 8. La botella sembrada alcanza confluencia entre 5 a 7 días, lo que permite hacer los subcultivos semanalmente.

Observaciones

- El medio debe estar al 10% con SBF para que las células crezcan.
- El número de pases es indistinto, se puede continuar cultivando a partir de la botella inicial. No tirar botellas a menos que sea necesario.
- Si se desea que las células crezcan más rápido, golpear vigorosamente la botella de cultivo
- Si el pH del medio parece estar ácido (color amarillo) y la botella todavía no está confluyente, se puede alcalinizar a rojo de nuevo añadiendo unos cuantos microlitros de bicarbonato de sodio al 75% estéril.
- Las células C6/36 prefieren el medio ácido cuando se encuentran en división, por lo que no afecta tanto el vire de coloración del medio en comparación con otras líneas celulares.

II. Protocolo para células Huh-7.

1. Retirar el medio de cultivo viejo por aspiración.
2. Lavar las células con una alícuota de PBS estéril 1X. por cada 25 cm² de superficie se debe emplear 1 mL de buffer de lavado. Realizar movimientos circulares para permitir que la solución entre en contacto con todas las unidades de la monocapa y pueda remover la mayor cantidad posible de detrito celular.



3. Retirar el PBS 1X por aspiración.
4. Añadir tripsina. Las células en una botella de 25 cm² se levantan con 1 mL de tripsina. Las de una botella de 75 cm² se levantan con 3 mL.
5. Incubar a 37°C durante 5 minutos. Procurar no exceder el tiempo para que la enzima no comience a degradar la membrana celular.
6. Neutralizar la actividad de la tripsina adicionando un volumen 1:1 de medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal.
7. Recolectar la suspensión celular en un tubo falcon de 15 mL.
8. Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
9. Cuidadosamente retirar el medio de cultivo utilizado para neutralizar la tripsina. Se puede dejar un poco de volumen para no romper el botón celular.
10. Añadir medio de cultivo nuevo dependiendo del tamaño del botón celular obtenido. Generalmente el botón obtenido a partir de una botella semiconfluente de 25 cm² requiere ser resuspendido en 3 mL de medio nuevo; mientras que un botón celular proveniente de una botella semiconfluente de 75 cm² se puede resuspender en 4 a 5 mL de medio.
11. Resuspender completamente con ayuda de una pipeta de 2 mL (o con una puntilla de 1000 µL) el botón celular en el medio nuevo hasta observar que no hay cúmulos flotando.
12. Preparar la botella de cultivo a sembrar con la cantidad de medio nuevo correspondiente y depositar en ella el volumen deseado de la suspensión celular.
13. Incubar a 37 °C con 5% CO₂.

Observaciones

- Las células no deben exponerse más de 10 minutos al PBS 1X y no más de 5 minutos a la tripsina.



- La suspensión celular obtenida al neutralizar la tripsina con medio de cultivo suplementado, se centrifuga para asegurar un nivel de compactación homogéneo. Cuando se disgrega de forma correcta se evita la formación de cúmulos celulares.
- Es recomendable flamear las bocas y las tapas de las botellas de cultivo después de abrir y antes de cerrar para evitar contaminación de su contenido.
- Si se emplean micropipetas automáticas, jamás permitir la entrada del vástago a las botellas, ya sean de cultivo celular o las correspondientes a los reactivos en uso.

III. Protocolo para células BHK-21

1. Aspirar el medio de cultivo del interior de la botella/placa con ayuda de una pipeta Pasteur, teniendo cuidado de no raspar la monocapa celular.
2. Para una botella T-25 o una placa P-100, adicionar 1 mL de tripsina 1X a temperatura ambiente. No precalentar la tripsina a 37°C, usar el baño de agua sólo para descongelarla, pero dejar que alcance temperatura ambiente de forma gradual. Permitir durante 50 segundos el contacto de la tripsina con la monocapa celular homogenizando con movimientos circulares el volumen añadido. De ninguna forma golpear la botella/placa.
3. Remover la tripsina por aspiración. Permitir que las células sigan en contacto con la tripsina residual durante otros 50 segundos.
4. Colocar 3 mL de medio MEM al 7%SBF en la botella/placa tripsinizada, y con ayuda de este volumen terminar de desprender las células, bañando la monocapa celular en ocasiones repetidas con el medio de cultivo adicionado.
5. Para mantenimiento de la línea celular, se recomienda que en una placa P-100 se coloquen 500 µL de las células desprendidas, si no, resuspender a la densidad celular deseada.



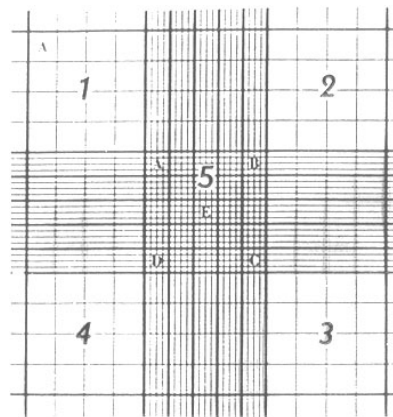
Observaciones

- No exceder tiempo con la tripsina. Las células BHK-21 son sensibles a su actividad proteolítica, por lo cual se debe manejar en tiempos cortos.
- Hacer recambio de medio cada 48 horas.
- Las células BHK están contaminadas con micoplasma, por lo cual no se recomienda sembrar densidades celulares muy altas, de tal forma que las células se puedan duplicar manteniendo baja la concentración del parásito intracelular. Por lo mismo, se recomienda tripsinizar dos veces por semana.
- Si se van a usar para ensayos de PFU, las células BHK21 dejan de plaquear en promedio alrededor de los cinco meses. Como alternativa, descongelar un vial nuevo más joven.
- Si se van a plaquear en formato de 24 pozos, no se recomienda sembrar densidades celulares para infectar 24 horas post-subcultivo. Usar una densidad de 3 a 5 x 10⁴ células/pozo y permitir que la confluencia aumente a un 80% en el transcurso de 48 horas.

3. RECUESTO CELULAR

Fundamento

La técnica de recuento celular utilizando el hemocitómetro o cámara de Neubauer fue diseñada por Louis-Charles Malasses. El dispositivo consta de una placa de vidrio con una cuadrícula grabada con láser en la cual es posible realizar el recuento de células o partículas en un volumen específico de un fluido. [Strober W (2001). ["Monitoring cell growth". In Coligan JE, Bierer BE, Margulies DH, Sherach EM, Strober W. Current Protocols in Immunology. 5. USA: John Wiley & Sons. p. A.2A.1.]



Esquema de la cuadrícula
de la cámara de Neubauer.

Para facilitar el recuento de células viables se utiliza un colorante vital, el azul tripano. Las células vivas captarán el colorante pero lo expelerán al medio, mientras que las células muertas lo mantendrán en su interior. Generalmente se preparan diluciones 1:4 o 1:8 de la suspensión celular a contabilizar. El resultado se obtiene multiplicando el número de células contadas en la cámara de Neubauer por el valor de la dilución realizada (4 u 8) por el valor del factor de la cámara (1×10^4).



Material

- Tubos eppendorf de 0.2 mL.
- Cultivos de células Huh-7.

Reactivos

- Medio de cultivo Advanced DMEM suplementado al 2% con suero bovino fetal.
- Colorante azul tripano. 100 mL. Marca GIBCO. Cat. 15250-061.

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Micropipetas automáticas.
- Cámara de Neubauer.
- Microscopio.
- Incubadora con tanque de CO₂.

Protocolo

1. Procesar las botellas de cultivo hasta la resuspensión y disgregación en medio nuevo de las células. Procurar una disgregación completa, sin que el medio presente cúmulos del cultivo flotando o suspendidos.
2. Tomar una alícuota de 60 µL de medio de cultivo nuevo y depositarla en un tubo cónico de 200 µL.
3. Medir una alícuota de 10 µL de la suspensión celular y depositarla en el tubo cónico del 200 µL. Procurar homogenizar completamente antes de realizar la medición, puesto que de

forma natural las células precipitan volviendo a formar el botón al fondo del tubo donde se centrifugaron.

4. Medir 10 µL del colorante azul tripano y colocarla en el tubo cónico de 200 µL



5. Mezclar con ayuda de una puntilla de 200 μL el volumen del tubo, subiendo y bajando su contenido sin formar burbujas.
6. Depositar 10 μL de la suspensión celular con colorante en la cámara de Neubauer.
7. Utilizando el objetivo de 10X en el microscopio, contar el número de células vivas en las cuatro cuadrículas de 4 x 4 de la cámara (Figura X, números 1, 2, 3 y 4). Registrar los números.
8. Contar el número de células en el cuadrante central de 5 x 5 (Figura X, número 5). Registrar la cantidad.
9. Realizar el cálculo del total de células empleando la siguiente fórmula:

$$\text{No. células/mL} = (\text{Promedio 4 x 4}) (\text{Factor de dilución}) (1 \times 10^4)$$

10. El número obtenido con el promedio de las cuadrículas de 4 x 4 debe ser similar al cálculo realizado con el total de células en la cuadrícula central de 5 x 5.
11. Multiplicar el número de células/mL por el volumen en el cual se resuspendieron y disgregaron las células del cultivo para obtener la cantidad total de células producidas.
12. Con respecto al total de células contabilizadas y el volumen total, colocar el volumen correspondiente al número de células deseado en la botella o placa de cultivo.



4. CONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Fundamento

Cuando una línea celular se expande en números suficientes, la congelación de células permite la generación de bancos que pueden almacenarse sin que el material envejezca. De esta forma las células también estarán protegidas de contaminación, fallas en la incubadora o agotamiento del medio de cultivo. Se recomienda congelar $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ células/mL en suero bovino fetal suplementado con un agente conservador (glicerol o DMSO) a una concentración del 5-10%, para proteger a las membranas del daño causado por los cristales de agua. La congelación debe ser lenta y se recomienda que el almacenamiento final se realice en un tanque de nitrógeno líquido, donde las células pueden permanecer viables durante varios años.

Material

- Cultivos celulares semiconfluentes.
- Micropipetas.
- Crioviales de 2 mL. Marca Corning. Cat. 430659.
- Tubos falcon de 15 mL. Marca Corning. Cat. 430053.

Reactivos

- Suero bovino fetal. 500 mL:
 - a) Para C6/36: Marca Hyclone.
 - b) Para Huh-7: Marca GIBCO.
- Dimetilsulfóxido (DMSO) grado Biología molecular. 100 mL. Marca Sigma. Cat. D2650.
- Hielo.



Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Bomba de presión y vacío.
- Centrífuga.
- Hielera.
- Refrigerador de -20 – 0 °C.
- Ultracongelador Revco.

I. Protocolo para células C6/36.

1. Cuando se observa un cultivo confluyente de células C6/36 en una botella de 25 cm², permitir que crezcan un día más.
2. Raspar las células de la botella con ayuda de un gendarme (cell scraper).
3. Colectar medio en tubo falcon y centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos. Si las células no han formado un pellet, centrifugar de nuevo.
4. Decantar medio de cultivo y resuspender en 2 mL de suero bovino fetal completo.
5. Depositar en el criovial 900 µL de la suspensión celular y añadir 10 µL de DMSO.
6. Enfriar células a 4 °C durante 5 minutos.
7. Pasar células a -20 °C durante dos horas. No exceder tiempo.
8. Almacenar células a -70 °C.
9. Se recomienda hacer pases de la línea celular cada 6 meses.

II. Protocolo para células Huh-7.

1. Cosechar células Huh-7 siguiendo el protocolo de subcultivo hasta la obtención del botón celular.



2. Remover completamente el medio utilizado para neutralizar la tripsina, empleando una micropipeta de 1000 μL y procurando no romper el botón celular.
3. Resuspender células en suero bovino fetal completo. Añadir tanto suero como sea necesario para obtener una suspensión con una concentración final de 1.5 a 2 millones de células por mL.
4. Preparar crioviales a congelar. Flamear el cuello y la tapa de cada uno de ellos.
5. Depositar en cada criovial 100 μL de DMSO. No flamear después de colocar el disolvente.
6. Depositar en cada vial 900 μL de la suspensión de células en suero bovino fetal.
7. Almacenar células en hielo (4 °C) durante 5 minutos.
8. Transfrir crioviales a refrigerador a -20 °C durante dos horas. No almacenar a esta temperatura por más de 3 horas.
9. Transferir células a ultracongelador Revco a -80 °C. Las células congeladas y almacenadas a esta temperatura tienen caducidad de un año.



5. DESCONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES

Fundamento

El proceso de congelación resulta estresante para las células. El uso de una buena técnica de descongelación asegura que una alta proporción de las células congeladas sobrevivan. Es importante evitar manipulaciones bruscas de los volúmenes de las alícuotas congeladas, ya que las membranas celulares se encuentran altamente sensibilizadas.

Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Botellas para cultivo celular de 25 cm².
 - e) Con filtro. Marca Corning. Cat. 430639.
 - f) Con tapa de rosca. Marca Corning. Cat. 430168.

Reactivos

- Medio de cultivo
 - a) Para C6/36: L-15 suplementado al 5% con suero bovino fetal.
 - b) Para Huh-7: Advanced DMEM suplementado al 2% con suero bovino fetal.

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Micropipetas automáticas.
- Microscopio.
- Incubadora.



Protocolo

1. Permitir atemperar el medio de cultivo a utilizar para sembrar las células al menos 40 minutos antes de la realización de la técnica. Después de sacar el medio del baño maría se debe limpiar con etanol al 70% antes de permitir su entrada a la campana de bioseguridad.
2. Depositar 5 mL de medio de cultivo atemperado en una botella de 25 cm².
3. Introducir criovial en baño de agua a 37°C hasta observar la descongelación de su contenido.
4. Depositar suavemente la alícuota completa del criovial y homogenizar el contenido de la botella con movimientos circulares suaves.
5. Revisar al microscopio las células recién depositadas en la botella de cultivo.
6. Incubar botella de cultivo bajo las condiciones requeridas dependiendo del tipo de línea celular que se trate.



- INFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES CON DENGUE -

6. CULTIVO VIRAL: AMPLIFICACIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE EN LÍNEAS CELULARES.

Fundamento

El cultivo viral del dengue es el estándar de oro para la confirmación y aislamiento de casos positivos. Empleando líneas celulares permisibles como C6/36, TRA-284-SF, AP-61 o Vero se pueden obtener grandes cantidades de partículas virales viables a partir de aislados de pacientes o macerados de mosquitos.

El proceso involucra la obtención del cultivo celular semiconfluyente, la adición del suero infeccioso y la adsorción de las partículas virales en la membrana celular. Se permite que el virus se replique de 7 a 14 días dependiendo del serotipo presente para su posterior cosecha o análisis por inmunofluorescencia. Los virus del dengue suelen ser citopáticos.

El protocolo descrito en este anexo se adaptó empleando la línea celular C6/36 de *Aedes albopictus* y las cepas virales H-159911 de DENV-1 y H-17247 de DENV-2.

Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 2 mL. Marca Fisherbrand. Cat. 11-678-11C.
- Cultivos confluentes de células C6/36 en botellas sin filtro de 25 cm².
- Virus prototipo Dengue 1 cepa H-159911 conservado a -80°C.
- Virus prototipo Dengue 2 cepa H-17247 conservado a -80°C.



Reactivos

- Medio L-15 suplementado al 2% con suero bovino fetal.
- Solución buffer salino de fosfatos (PBS) 1X.

Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Pipetor.

Protocolo

1. Sembrar células C6/36 hasta obtener una monocapa confluyente bajo las condiciones indicadas en el protocolo correspondiente.
2. Desechar medio de cultivo por decantación.
3. Lavar células con 3 mL de solución PBS 1X para remover el detrito celular. Realizar movimientos circulares para limpiar la monocapa completa.
4. Remover PBS 1X.
5. Recambiar medio por L-15 al 2% SBF, en un volumen adecuado para cubrir solamente las células (25 cm²: 2 mL, 75 cm²: 3.5 mL, tubo Nunc: 1 mL).
6. Adicionar al medio 100 – 150 µL del aislado viral.
7. Homogenizar botella con movimientos circulares para asegurar que el virus tenga contacto con la monocapa celular completa.
8. Incubar a 37°C durante una hora al menos.
9. Transcurrida la hora de incubación, completar volumen del medio de cultivo a los indicados en el apartado de subcultivo celular.
10. Incubar a temperatura ambiente sin fuente de CO₂.



Observaciones

- El medio de cultivo para infección viral debe estar al 2% SBF para permitir el mantenimiento celular pero evitar su división, permitiendo que el virus las infecte sin que mueran.
- Para cada serotipo viral utilizar una alícuota de medio distinta.
- Normalmente una botella de 25 cm² se infecta con 30 – 35 µL del aislado viral, pero la infección con 100 µL permite una producción mayor de partículas virales.
- Si durante el periodo de incubación el medio se torna ácido, añadir unas gotas de solución al 7.5% de bicarbonato de sodio para dejar el medio ligeramente alcalino.
- Si la infección se hace en tubos (Nunc, Nunclon surface), cultivar células a confluencia depositando 2.5 mL de la suspensión 1:10 de células proveniente de botella de 75 cm² (medio 10% SBF). Antes de realizar la infección hacer el recambio al medio correspondiente. Si las células se encuentran muy crecidas, vortexear tubo para poder eliminar las células excedentes al momento de decantar el medio y dejar una monocapa en el tubo. Primero colocar 1 mL de medio al 2% SBF, infectar con 17 µL del aislado viral e incubar 37°C. Transcurrido el tiempo, completar volumen de medio a 2.5 mL.
- DENV prefiere un pH alcalino en el medio para infectar a las células C6/36.



7. COSECHA Y ALMACENAMIENTO DE AISLADOS VIRALES.

Fundamento

Los virus en cultivo se pueden cosechar para establecer bancos con prototipos virales o para confirmar casos de pacientes enfermos por inmunofluorescencia o técnicas moleculares. Dependiendo del serotipo infectante, el tiempo de cultivo varía. Generalmente dengue 1 y 2 son de crecimiento rápido y la mayoría son líticos, mientras que dengue 3 y 4 requieren más tiempo y no ocasionan cambios morfológicos tan notorios en la monocapa celular.

La suspensión células/virus se debe tratar con una mezcla de suero bovino fetal y bicarbonato de sodio para después almacenarse en un ultracongelador. Se puede realizar una purificación mayor del aislado por centrifugación diferencial.

Material

- Pipetas serológicas de 5 mL. Marca Corning. Cat. 4487.
- Pipetas serológicas de 2 mL. Marca Fisherbrand. Cat. 11-678-11C.
- Raspadores celulares (gendarmes) de 25 cm. Marca Corning. Cat. 3010.
- Tubos falcon de 15 mL. Marca Corning. Cat. 430053.
- Tubos eppendorf de 1.5 mL estériles.

Reactivos

- Suero Bovino Fetal. 500 mL. HyClone. Cat. sh30396.03.
- Solución de bicarbonato de sodio al 7.5% esterilizado por membrana, 100 mL, In vitro S.A.



Equipo

- Campana de flujo laminar.
- Micropipetas automáticas.
- Pipetor.
- Hielera.
- Ultracongelador Revco.

Protocolo

1. Transcurridos de 12 a 15 días de la infección celular, se puede cosechar el virus.
2. Si el cultivo se hizo en tubo, vortexear para desprender las células. Si el cultivo se realizó en frascos, raspar con gendarme. No hacer lavados con PBS.
3. Recolectar medio de cultivo y centrifugar para empaquetar las células.
4. Del sobrenadante coleccionar alícuotas y si es necesario, reinfectar un cultivo nuevo con 100 μ L de ellos (botella de 25 cm^2).
5. Preparar la mezcla de congelación 90% suero bovino fetal: 10% bicarbonato de sodio al 7.5% en un tubo falcon de 15 mL.
6. Para congelar las alícuotas del virus, de los 6-8 mL que resultan de una botella de 25 cm^2 , añadir 1.5 de mezcla SBF-Bicarbonato y dividir en viales de 1 mL.
7. Almacenar a -70°C .

Observaciones

- La mezcla suero bovino fetal - bicarbonato se usa para proteger las partículas virales. El pH básico les proporciona estabilidad.



- PROTOCOLOS PARA MANEJO DE RNA -

8. EXTRACCIÓN DE RNA.

Fundamento

TRIzol (Invitrogen), es una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, que se emplea para la extracción de RNA basada en el método desarrollado por Chomczynski y Sacchi. [*Anal. Biochem.* 162 :156-9, 1987.] Durante la homogenización de la muestra, el reactivo mantiene la integridad del RNA mientras lisa las células y disuelve componentes celulares. La adición de cloroformo y la posterior centrifugación, separa la mezcla en dos fases (acuosa y orgánica). El RNA se precipita añadiendo isopropanol a la fase acuosa y se recupera por centrifugación.

Material

- Microtubos de 1.5 mL. Marca Axygen. Cat. MCT-150-C.
- Microtubos de 2 mL. Marca Axygen. Cat. MCT-200.
- Pipetas automáticas.

Reactivos

- TRIzol.
- Cloroformo. 500 mL. Sigma-Aldrich. Cat. 2432-500mL.
- Isopropanol.
- Etanol al 70% en agua DEPC.
- Agua DEPC.

Equipo

- Centrífuga refrigerada.
- Campana de flujo laminar.



Protocolo

1. Remover medio por aspiración de la botella o los pozos de la placa de cultivo. No hacer lavado con PBS.
2. Fase de homogenización: Adicionar 1 mL de TRIzol a una botella de 25 cm² para su lisis. En el caso de hacer la extracción de RNA a un extracto viral, usar una proporción 1:1 volumen, La adición del TRIzol debe hacerse a 4°C.
3. Fase de separación: Incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas.
4. Transferir la mezcla de TRIzol a un tubo eppendorf de 2 mL.
5. Añadir 40 µL de cloroformo frío por cada 200 µL de TRIzol empleados. Mezclar por inversión 15 segundos.
6. Incubar el tubo en hielo de 2 a 3 minutos.
7. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
8. Fase de precipitación: Recuperar la fase acuosa y adicionarle 500 µL de isopropanol frío por cada mililitro de TRIzol empleado.
9. Incubar a -80°C durante una hora o toda la noche.
10. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
11. Fase de lavado: Remover el sobrenadante y lavar la pastilla con 1 mL de etanol frío por cada mililitro de TRIzol empleado. Mezclar con vórtex.
12. Centrifugar a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
13. Fase de resuspensión: Retirar etanol sin tocar la pastilla con la puntilla.
14. Dar un pequeño spin a temperatura ambiente para poder eliminar los restos de etanol en el tubo con ayuda de una puntilla de 10 µL.
15. Resuspender la pastilla en 20-30 µL de agua DEPC con 1 µL de inhibidor de RNAsas (RNAout o RNAsin).



9. SÍNTESIS DE CDNA (RETROTRANSCRIPCIÓN).

Fundamento

En la reacción de retrotranscripción, se sintetiza cDNA (DNA complementario) a partir del RNA por acción de la enzima retrotranscriptasa reversa. En este protocolo la enzima empleada es la MMLV (Molones Murine Leucemia Virus), obtenida de forma recombinante y purificada a partir de E. coli. Posee actividad 5'-3' ribonucleasa H, la cual permite alongar las cadenas de cDNA hasta una longitud mayor a 7 Kb.

Material

- Microtubos de 0.2 mL. Marca Axygen. Cat. PCR-02-C1.

Reactivos

- Buffer RT 5X
- Random primers 0.02 mg/mL
- DTT 0.01 M
- dNTPs 10 mM
- Inhibidor de RNAsas 40 U/mL
- Agua mili Q tratada con DEPC

Equipo

- Pipetas automáticas.
- Termociclador. Marca Applied Biosystems. Modelo GeneAmp PCR System 9700.



Protocolo

1. Colocar en un tubo eppendorf de 0.2 mL 1 μ L de random primers, 3 μ L de RNA y 7.5 μ L de agua DEPC.
2. Colocar los tubos en el termociclador a 72 °C durante 10 minutos.
3. Incubar la muestra en hielo durante 3 minutos.
4. Preparar la siguiente mezcla de reacción: 4 μ L de buffer RT 5X, 2 μ L de DTT 0.1 M, 0.5 μ L de inhibidor de RNAsas y 1 μ L de dNTPs 10 mM.
5. Añadir 8 μ L de la mezcla de reacción al tubo que se incubó en hielo, así como 1 μ L de la enzima MMLV.
6. Colocar el tubo en el termociclador y continuar con el siguiente programa:
 - a) 10 minutos/ 25 °C.
 - b) 60 minutos/ 37 °C.
 - c) 5 minutos/ 94 °C.
 - d) 10 minutos/ 4 °C.
7. Terminando el programa del termociclador, retirar el tubo que contiene el cDNA y almacenarlo a -20°C hasta su uso.

Condiciones de reacción	
Reactivo	Volumen
Buffer RT 5X	4 μ L
DTT 0.1 M	2 μ L
RNAse out	0.5 μ L
dNTPs 10 mM	1 μ L
RT-MMLV 200U/mL	1 μ L
Volumen total	8.5 μL

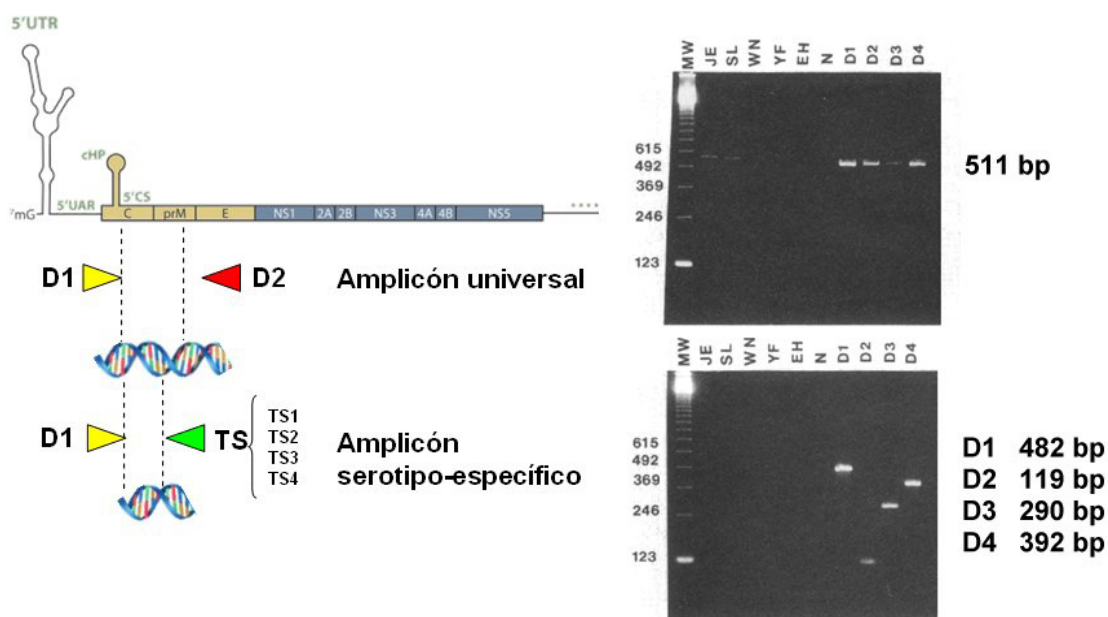
Programa del termociclador		
Paso	Temperatura	Tiempo
1	72 °C	10 minutos
2	25 °C	10 minutos
3	37 °C	60 minutos
4	94 °C	5 minutos
5	4 °C	10 minutos

- DETECCIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DEL DENGUE -

10. SEROTIPIFICACIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE POR EL PROTOCOLO DE LANCIOTTI.

Fundamento

El diagnóstico de laboratorio de las infecciones por dengue incluye técnicas moleculares como la RT-PCR, para la cual se han reportado y publicado más de 16 protocolos diferentes. Sin embargo, el protocolo cuyo uso se encuentra más extendido a nivel mundial es el reportado por Lanciotti y colaboradores en 1992. El protocolo involucra un par de primers universales para los cuatro serotipos del dengue (primers D1 y D2), que hibridan sobre la región C y pre-M del genoma viral. Posteriormente en una segunda ronda de amplificación, utilizando primers específicos para cada serotipo ('Type Specific primers', TS: TS1, TS2, TS3 y TS4) se amplifica un fragmento con un tamaño particular para cada serotipo viral. [J. Virol. Meth. 72:27-41].



Esquema de amplificación para la serotipificación del DENV.



Se ha reportado que este ensayo excede la sensibilidad obtenida por amplificación viral en cultivo celular cuando se usan alícuotas de la misma muestra, y se usa ampliamente para diagnóstico y monitoreo del dengue, particularmente en países del sureste de Asia. [*J. Clin. Microbiol.*, August 2003, p. 3864-3867, Vol. 41, No. 8].

Material

- Microtubos de 0.2 mL. Marca Axygen. Cat. PCR-02-C1.

Reactivos

- Taq DNA Polymerase recombinante.
- Buffer 10X para PCR sin Mg^{+2}
- Cloruro de magnesio 50 mM.
- Primers D1, D2, TS1 y TS2.
- dNTPs.
- Agua miliQ
- Agarosa Ultrapure. Marca Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Equipo

- Termociclador. Marca Eppendorf. Modelo Mastercycler gradient.
- Cámara de electroforesis. Marca Owl. Modelo B1A.
- Fuente de poder. Marca Bio Rad. Modelo Power Pac 100.
- Horno de micro-ondas. Marca Panasonic.



Protocolo

Condiciones de reacción:

PCR D1-D2		PCR D1-TS	
Reactivo y concentración	Volumen (µL)	Reactivo y concentración	Volumen (µL)
Agua Mili Q	13.8 µL	Agua Mili Q	12.2 µL
Buffer PCR 10X	2 µL	Buffer PCR 10X	2.5 µL
MgCl ₂ 50 mM	1.5 µL	MgCl ₂ 50 mM	1.5 µL
dNTPs 10 mM	0.5 µL	dNTPs 10 mM	0.5 µL
Primer D1 10 µM	0.7 µL	Primer D1 10 µM	1 µL
Primer TS1 10µM	0.7 µL	Primer TS1 10 µM	0.5 µL
Taq polimerasa	0.3 µL	Primer TS2 10 µM	0.5 µL
cDNA	5 µL	Primer TS3 10 µM	0.5 µL
Volumen total	25 µL	Primer TS4 10 µM	0.5 µL
		Taq polimerasa	0.3 µL
		cDNA	5 µL
		Volumen total	20 µL

Programa para la amplificación de DENV1 y DENV2.

Paso	Temperatura	Tiempo
1	94 °C	5 minutos
2	94 °C	1 minuto
3	60 °C	40 segundos
4	72 °C	40 segundos
5	Ir al paso 2, 40 veces	
6	72 °C	10 minutos
7	4°C	Esperar



11. PROTOCOLO DE TITULACIÓN VIRAL

Reactivos

Carboximetil celulosa viscosidad media SIGMA cat. C4888-500G.

Naphtol Blue Black SIGMA cat. N3393-25G

Ácido acético glacial. J.T. Baker cat. 9508-05.

Preparación de reactivos

Medio de cultivo MEM 2X

1. Seguir el mismo protocolo de preparación del medio MEM normal, pero pesar 4.8 g de medio MEM, 1.1 g de NaHCO_3 y llevar a un volumen de 250 mL.
2. Suplementar con 2.5 mL de penicilina-estreptomicina y si no hay crecimiento en la prueba de esterilidad, suplementar con 10 mL de SBF.
3. Importante: El medio MEM 2X puede precipitar al realizar la prueba de esterilidad. No representa ningún problema ya que los sólidos que precipitan se disolverán al momento de la preparación de la carboximetilcelulosa al 0.8%.

Carboximetilcelulosa al 1.6%

1. Pesar 2 g de carboximetilcelulosa de viscosidad media y adicionarlos lentamente a 125 mL de agua mili Q. Hacer esta mezcla en una botella de cristal de 250 mL de capacidad.
2. Permitir agitación mecánica de la suspensión hasta que se disuelva todo el sólido o hasta que la viscosidad de la mezcla impida que el agitador magnético realice su función de forma correcta.
3. Esterilizar inmediatamente y almacenar a 4°C.

**Carboximetilcelulosa al 0.8% en medio MEM.**

1. En el frasco donde se preparó la carboximetilcelulosa al 1.6%, adicionar bajo condiciones de esterilidad, 125 mL de medio MEM 2X.
2. Empleando agitación magnética homogenizar la mezcla sin generar muchas burbujas en su interior.
3. Almacenar a 4°C y no abrir la botella fuera de la campana de cultivo celular.

Naphtol Blue Black para tinción de placas

1. Pesar 250 mg de Naphtol Black Blue, 3.4 g de acetato de sodio y disolver en 200 mL de agua miliQ empleando agitación magnética.
2. Adicionar 15 mL de ácido acético glacial y aforar a 250 mL con agua miliQ.
3. Dejar reposar 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Almacenar a temperatura ambiente, protegido de la luz con papel aluminio.

Protocolo**I. MONTAJE DEL ENSAYO E INFECCIÓN VIRAL.**

1. Sembrar previamente células BHK21 en formato de 24 pozos, empleando una densidad de siembra de 3×10^4 células/pozo y permitir que la confluencia aumente a un 80% en el transcurso de 48 horas antes de infectarlas.
2. En 8 tubos Eppendorf de 0.6 mL colocar 450 μ L de solución de Hanks.
3. Preparar diluciones seriadas colocando 50 μ L del extracto viral en el primer tubo. Vortexearlo y transferir 50 μ L de la dilución preparada y sin tocar el líquido, en el siguiente tubo.



Es importante cambiar la puntilla entre diluciones para evitar el arrastre de partículas virales entre ellas.

4. Incubar 10 minutos a 37°C las diluciones virales seriadas.
5. Remover por aspiración el medio de cultivo de las células BHK, excepto a las células de los pozos NTC. Rotular la placa con los datos pertinentes.
6. Añadir 200 µL de la dilución viral más baja al pozo correspondiente y su duplicado. Cubriendo con la tapa de la placa los pozos cercanos para que no se contaminen entre ellos.
7. Sin cambiar la puntilla, continuar colocando las siguientes diluciones virales en los pozos correspondientes en orden de concentración creciente.
8. Incubar la placa durante una hora a 37°C.
9. Transcurrido el tiempo, adicionar 1 mL de CMC 0.8% a cada pozo.
10. Incubar durante 5 días a 37°C/5% CO₂.

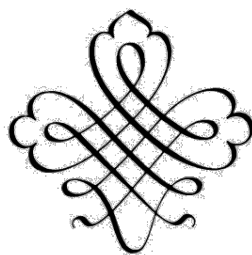
II. TINCIÓN DE PLACAS

1. Remover medio con CMC por aspiración.
2. Añadir Naphtol Black blue a cada pozo cubriendo la monocapa completamente. No es necesario añadir un volumen exacto, menos de 1 mL debe funcionar.
3. Incubar a temperatura ambiente las placas durante 30 minutos.
4. Lavar la placa decantando el colorante en la tarja y sumergiéndola en un molde con agua. Repetir tres veces.
5. Sacudir placa teñida en una toalla de papel y una vez seca, realizar el recuento de focos de lisis.



III. RECuento DE FOCOS LÍTICOS.

1. Contar el número de focos líticos en cada pozo hasta donde se puedan observar bien definidos.
2. Dividir entre 200 μL el número de placas líticas contadas y multiplicarlas por 1000 μL . Multiplicar el resultado obtenido por el valor de la dilución más baja en donde se observan las placas.
3. En caso de que exista disparidad entre los resultados de los duplicados, promediar los títulos obtenidos entre ellos dos.



RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO



Daniel Arellanos Soto

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias en el programa de Biología Molecular e Ingeniería Genética de la Facultad de Medicina, UANL.

Tesis: **EVALUACIÓN DE LOS PERFILES DE RESPUESTA A INTERFERÓN INDUCIDOS COMO RESPUESTA A LA INFECCIÓN CON EL VIRUS DEL DENGUE**

Campo de estudio: Ciencias de la salud.

Biografía:

Nacido en Xalapa, Veracruz el 18 de enero de 1982. Hijo de José Luis Arellanos Melgarejo y María de Lourdes Soto Montano.

Educación:

Químico Farmacéutico Biólogo por la Facultad de Ingeniería y Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana (Agosto 2000 – Enero 2005).

Maestro en Ciencias con orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética por la Facultad de Medicina, UANL. (Agosto 2008 – Enero 2011)

Experiencia profesional:

Profesor de Química a nivel Secundaria en la EST No. 105 (enero 2007 – agosto 2008).

Profesor de laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular en la carrera de MCP, en la Facultad de Medicina, UANL. (agosto 2010 – julio 2011)

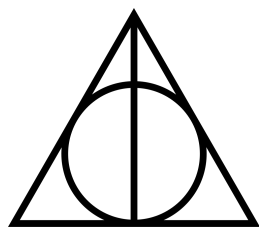
Estancias de investigación:

Laboratorio de Arbovirología del Centro de Investigaciones Regionales 'Dr. Hideyo Noguchi' de la Universidad Autónoma de Yucatán. Febrero-marzo 2010. Bajo la dirección de la Dr. C. María Alba Loroño Pino.

Laboratorio de Virología del departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. CINVESTAV Unidad Zacatenco, México, D.F. Marzo – abril 2012 y agosto – octubre 2012. Bajo la dirección de la Dr. C. Rosa María Del Ángel Núñez de Cáceres.

Contacto:

d_arellanos_s@yahoo.com



"Do not pity the dead, Harry. Pity the living,
and, above all those who live without love."

-J.K. Rowling